Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547414_0023

Über das Histozym.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

philosophischen Fakultät II. Sektion

der Bayer. Ludwig-Maximilians-Universität München

eingereicht

von

Theodor Dorfmüller

aus Bayreuth

am 14.4.1928

wenden!

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Berichterstatter: Professor Dr. H. Wieland

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Februar 1929

Diese Arbeit wurde in der organischen Abteilung des Chemischen Laboratoriums der Bayerischen Akademie der Wissenschaften in München ausgeführt.

Herr Professor Dr. E.WALDSCHMIDT-LEITZ gab die Anregung dazu und unterstützte mich bei der Ausführung mit liebenswürdigem und wertvollem Rat.

Besonderen Dank schulde ich noch
Herrn Geheimrat R.WILLSTÄTTER und
Herrn Geheimrat H.WIELAND, sowie
Herrn Professor W.PRANDTL

für das Interesse, das sie meinem Studium entgegenbrachten.

I N H A L T.

Seite

I. EINLEITUNG 1

Vorkommen und Wirkung. Physiologische Bedeutung. Verhältnis zu den Peptidasen. Präparative Verwendung zur Peptidsynthese, zur Spaltung racemischer Gemische von Aminosäuren und Peptiden. Analytische Verwendung. Ziel und Einteilung der Arbeit.

II. A. ERKENNUNG, MESSUNG UND BESCHREIBUNG DER HISTOZYMS.

1. Ausgangsmaterial, Herstellung der Enzymlösungen. Löslichkeit des Histozyms 12

2. Untersuchungsmethode 14

3. Einfluß des p_H 16

4. Beeinflussung der Histozymwirkung durch Zusätze 19

5. Kinetik des Histozyms 23

6. Bestimmungsmethode. Enzymeinheiten 26

B. NIERENPROTEASEN.

1. Trypsin 29

2. Nierenerepsin 31

C. NIERENESTERASE 38

III. ADSORPTIONSVERHALTEN DES HISTOZYMS UND SEINE TRENNUNG VON NIERENEREPSIN UND -ESTERASE

A. Allgemeiner Teil 39

B. Experimenteller Teil.

1. Adsorption des Histozyms mit Tonerde, Kaolin und Eisenhydroxyd im Vergleich zum Erepsin 50

2. Adsorption der Nierenesterase durch Eisenhydroxyd, Tonerde, Kaolin im Vergleich zum Histozym 52

3. Adsorption bei verschiedener Enzym- und Glycerinkonzentration 52

a) mit Kaolin bei p_H = 7,0
b) mit Tonerde bei p_H = 4,7

4. Adsorption mit Eisenhydroxyd, dann mit Tonerde 53

Seite

5. Voradsorption des Erepsins mit Tonerde, Adsorption des Histozyms mit Kaolin, Elution des Adsorbats mit Ammoniak 54

a) Vorversuch 1: Adsorption mit viel Kaolin, Elution mit Ammoniak.
b) Vorversuch 2: Adsorption mit wenig Kaolin, Elution mit Ammoniak.
c) Hauptversuch.

6. Adsorption des Erepsins mit Tyrosin 56

7. Adsorption mit Tyrosin, dann mit Tonerde .. 57

8. Adsorption mit Tyrosin, dann mit Eisenhydroxyd 58

9. Adsorption mit Hippursäure 58

10. Adsorption mit Kasein 58

11. Elution mit Phosphatpuffern aus Tonerde ... 59

a) mit Sekundärphosphat,
b) mit Phosphatgemisch vom $p_H = 7,0$,
c) mit Primärphosphat.

12. Elution mit Ammoniak 60

a) aus Kaolin, b) aus Tonerde,
c) aus Tonerde(fraktioniert)
d) aus Eisenhydroxyd.

13. Elution mit Hippurat 61

a) aus Kaolin, b) aus Eisenhydroxyd
c) aus denaturiertem Protein.

14. Elution mit Leucylglycin aus Eisenhydroxyd. 61

15. Temperaturbeständigkeit des Histozyms im Vergleich zum Nierenerepsin 62

a) verdünnter Glycerinextrakt bei 70°.

aa) bei $p_H = 7,0$ bb) bei $p_H = 8,4$
cc) bei $p_H = 4,7$

b) unverdünnter Glycerinextrakt bei 70° u. 85°

16. Adsorptionsverhalten der nach 15 b gewonnenen Enzymlösung 63

17. Trennung des Histozyms von Nierenerepsin und Esterase. Haltbarkeit der reinen Histozympräparate 66

IV. ZUR SPEZIFITÄT DES HISTOZYMS 68

I. EINLEITUNG.

Die Fähigkeit der N i e r e , Hippursäure einerseits zu spalten in Benzoesäure und Glykokoll, andererseits aufzubauen aus diesen Komponenten, führte schon SCHMIEDEBERG, der Entdecker dieser Reaktion[1], auf ein spezifisches Ferment, das H i s t o z y m , zurück. Später fand man es noch in L e b e r , M u s k e l , B l u t , G e w e b e n von S ä u g e t i e r e n[2], in P i l z e n[3] und B a k t e r i e n[4].

---

1) O. SCHMIEDEBERG, Arch.f.exp.Path. 14, 382 (1881).

2) O. MINKOWSKY, Arch.f.exp.Path. 17, 445 (1883): Hundeleber, -milz, -muskeln, -blut; Kaninchen- und Hornviehblut.
A.v.d.VELDE u.B.I.STOCKVIS, Arch.f.exp.Path. 17, 208 (1883): Kaninchenblut u. -nieren.
M.JAKOBY, Bio. 30, 168 (1900): Ochsenleber.
M.NENKI, (mit E.BLANK u.A.PANOWA), Arch.f.exp. Path., 20, 367, 376 (1886): Gewebe der Bauchspeicheldrüse.

3) I.NIKITINSKY, Jhrb.f.wiss.Bot. 40, 1 (1904); K.SHIBATA, Hofm. 's Beitr. 5,392 (1904): aspergillus niger; A.W.DOX, Il.of.Biol.Ch.6,461(1909), St.BIEREME, C.Bakt.(2), 23, 709 (1909); O.HAGEM, Videnskalbs-Selbskabets Skrifter, I.Math.-naturw.Kl. 1910, Nr. 4; A.KOSSOWITZ, Zs.f.Gärungsphys. I, Bd.60. S.121, 317 (1912); Bd.2, S.51, 81 (1912): in verschiedenen Pilzen.
E.NEUBERG, Bio. 145, 186; 147, 370, 372 (1924): Takadiastase aus aspergillus oryzae.

4) B.I.van TIEGHEM, Compt.rend. 58, 210 (1864); W.SCHELMANN, Diss. Göttingen 1902, Y.SEO, Arch. f. exp.Path. 58, 440 (1908): Bakterien.

Die hydrolytische W i r k s a m k e i t des Histozyms erstreckt sich ganz allgemein auf b e n z o y l i e r t e A m i n o s ä u r e n u n d P e p t i d e [1]; beobachtet wurde ferner noch die Zerlegung von A c e t y l g l y c i n [2] und P h e n a c e t u r s ä u r e [3], die Abspaltung von Cholalsäure aus G l y k o c h o l - und T a u r o c h o l s ä u r e [4]; die Hydrolyse von S ä u r e a m i d e n , wie Acetamid, Acetanilid, Benzamid, Oxamid usw. wird in der Literatur [5] ebenfalls dem Histozym zugeschrieben.

Dieses besitzt eine ausgeprägte o p t i s c h e S p e z i f i t ä t , die schon von N. MUTCH [6] und I.A. SMORODINZEW [7] am Beispiel des Bezoylalanins bezw. der Benzoylaminobuttersäure beschrieben worden ist und die nach R. WILLSTÄTTER, E.WALDSCHMIDT-LEITZ und J.GRÄSER [8] unabhängig von der Herkunft des Enzyms so gekennzeichnet ist, daß fast in allen Fällen nur die Derivate

---

1) N.MUTCH, J.of Physiol. 44, 176 (1912); I.A.SMORODINZEW, H. 124, 123 (1922); R.WILLSTÄTTER, E.WALDSCHMIDT-LEITZ u. J.GRASER, noch unveröffentlicht.

2) A.W.DOX u.R.E.NEIDIG, H.85, 68 (1913); A.W.DOX u.W.F. RUTH, Biochem.Bull. 3, 23 (1913): in verschiedenen Pilzen.

3) E.NEUBERG, l.c.

4) I.A.SMORODINZEW, l.c.

5) In tierischen Geweben und Organen: GONNERMANN, Pflüger's Arch. 89, 493 (1902); 95, 278 ( ); P.BERGELL u. Th.BRUGSCH, H. 67, 97 (1910):Aminosäureamide.
In aspergillus niger: SHIBATA, Hofm.' Beitr. 5, 385 (1904).
In penicillium Arten: A.W.DOX, Jl.of Biol.Ch.6, 461

6) l.c. 7) l.c. 8) l.c.

der l- bezw. der natürlich vorkommenden Aminosäure-antipoden gespalten werden.

Viel Beachtung hat das Histozym bisher von physiologischer Seite gefunden; ist doch die Bildung von Hippursäure neben der von „Ätherschwefelsäuren" und „gepaarten Glukuronsäuren" einer der wichtigsten Entgiftungsprozesse des Organismus und nach dem jetzigen Stand unserer Kenntnisse die einzige Synthese, die in der Niere selbst stattzufinden scheint[1].

Vom Gesichtspunkt der Protein- und Proteasenforschung aus gewinnt das Histozym auch für den Chemiker mehr und mehr an Interesse. Nach dem oben Gesagten ist das Enzym wirksam gegenüber Säureamidbindungen, an deren Aufbau in den meisten untersuchten Fällen auf der einen Seite eine Aminosäure beteiligt ist, und man könnte sich versucht fühlen, das Histozym zu den Peptidasen[2] zu rechnen. Die Spaltung von Säureamiden wäre kein Gegenbeweis, nachdem beim Hefetrypsin[3] die gleiche Wirkung erkannt ist. Es wurde zwar nachgewiesen, daß reines Erepsin[4] und reines Trypsin[5] nicht auf

---

1) I.SNAPPER, A.GRÜNBAUM u. I.NEUBERG, Bio. 145, 40 (1924); vgl. BUNGE u. SCHMIEDEBERG, Arch.f.exp. Path.u.Pharm. VI; KOCHS, Pflüger's Arch. 120, 64; BASHFORD u. CRAMER, H. 36, 224; N.MUTCH, l.c.

2) Im Sinne der Veröffentlichung von E.WALDSCHMIDT-LEITZ, W.GRASSMANN u. H.SCHLATTER, Zur Spezifität proteolytischer Enzyme, B. 60, 1908 (1927).

3) W.GRASSMANN, In Veröffentlichung.

4) O.COHNHEIM, H. 52, 526 (1907).

5) W. GULEWITSCH, H. 27, 551 (1899).

Hippursäure wirken; allein es handelte sich in diesen Fällen um die Enzyme der Verdauungssekrete. Schon frühere Arbeiten[1] hatten gezeigt, daß die bei saurer Reaktion optimal wirkenden T r y p t a s e n von Niere und Milz, untereinander gleich, sich von dem im alkalischen Gebiet wirksamen Verdauungstrypsin unterscheiden. Neuere Untersuchungen von E.WALDSCHMIDT-LEITZ und W.DEUTSCH[2] ergaben auch bei Milz- E r e p s i n bemerkenswerte Abweichungen von den bei Darm- und Pankreas-Erepsin beobachteten Erscheinungen. Ein ähnliches Verhalten des Nierenerepsins war von vornherein nicht von der Hand zu weisen, eine mögliche Identität einer der beiden Nierenpeptidasen mit dem Histozym konnte nicht als durch die weiter oben mitgeteilten Gegenbefunde widerlegt gelten und eine neue Prüfung dieser Frage mußte wünschenswert erscheinen. Um das Ergebnis gleich hier vorweg zu nehmen: Es gelang durch Extraktion von Nieren mit 87 %igem Glycerin ohne weitere Operationen eine Lösung von starkem Histozymgehalt zu erhalten, die frei von Tryptase[3] war; das gegen Leucylglycin wirksame Ferment unterscheidet sich nach p_H-Optimum, Reaktionsverlauf, Adsorptionsverhalten nicht von tierischem Verdauungserepsin[4] und ließ

---

1) K.G.DERNBY, Jl.of Biol.Ch. 35, 179 (1918); BRADLEY, Jl.of Biol.Ch. 52, 466 (1922); S.G.HEDIN H. 122, 307 (1922). - S.G.HEDIN u. S.ROWLAND, H. 32, 531 (1901); H.D.DAKIN, Jl. of Physiol. 30, 84 (1904).

2) H. 167, 285 (1927).

3) Teil II, B, 1 dieser Arbeit.

4) Teil II, B, 2 dieser Arbeit.

sich durch später näher zu beschreibende[1] Adsorptions- und Elutionsvornahmen, denen eine Hitzebehandlung vorausging, vom Histozym abtrennen. Damit ist bewiesen, daß Histozym mit keiner bekannten Peptidase identisch ist, und so zugleich eine wichtige Voraussetzung für seine präparative Verwendung gegeben.

Eine systematische Bereitung von Peptiden aus natürlich vorkommenden, auch komplizierteren Aminosäuren scheint heute für unsere Kenntnisse von den Eiweißstoffen [2) 3)] und den eiweißspaltenden Fermenten[3] besonders wichtig. Zur Peptidsynthese fanden neben der Aufspaltung [4)] von Aminosäureanhydriden (Diketopiperazinen) zu Dipeptiden und der Verdoppelung gewisser Peptidketten durch Erhitzen ihrer Ester [5)] vor allem die beiden klassichen Methoden E. FISCHERs Anwendung, die sich der Reaktionsfähigkeit von Säurechloriden bedienen: Man verwandelt Aminosäuren in ihr Säurechlorid[6], das man mit dem Aminoteil anderer Aminosäuren oder Peptide kuppeln kann. Oder man benutzt an Stelle des Aminosäurechlorids ein verwandtes Halogenacylchlorid[7] für die Kupplungsoperation und amidiert nachträglich. Große Erfolge haben beide Verfahren erzielt, wenn es sich darum handelte, Glykokoll, Alanin, Leucin oder ähnliche einfache Aminosäu-

---

1) Teil III, B. 17 dieser Arbeit.

2) M. BERGMANN, F.STERN u. Ch.WITTE, Ann.449, 277(1926);
M. BERGMANN u. H.KÖSTER, H. 167, 91 (1927)

3) E. WALDSCHMIDT-LEITZ u.A.HARTENECK, H.149, 203(1925);
E. WALDSCHMIDT-LEITZ u.A.SCHÄFFNER, H.151, 31(1925);
E. WALDSCHMIDT-LEITZ, W.GRASSMANN u.H.SCHLATTER B. 60, 1906 (1927)

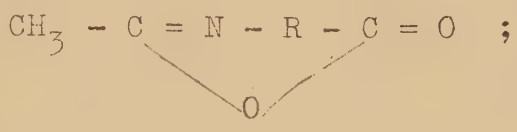
4) E. FISCHER u. E.FOURNEAU, B.34 2870 (1901)

5) E. FISCHER B. 35, 1100 (1902)

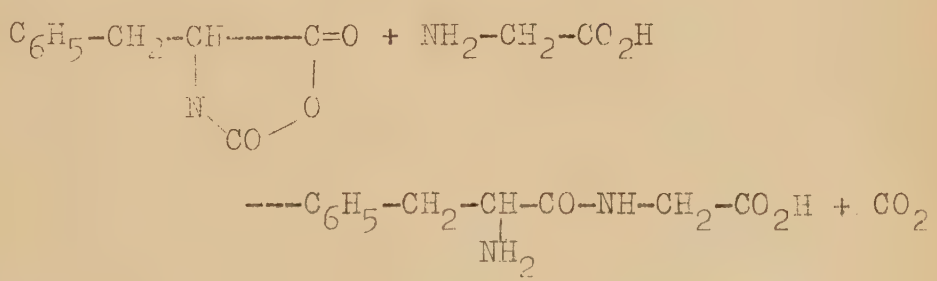
6) B. 36, 2094 (1903).

7) B. 36, 2106 (1903).

ren in Peptidketten einzuführen. Bei wichtigen komplizierteren Aminosäuren wie Phenylalanin, Tyrosin, Arginin liefern sie häufig unerwünschte Nebenreaktionen und schlechte Ausbeuten. Von den neueren Versuchen, die diesem Nachteil abhelfen wollen, ist sicher der BERGMANNs der glücklichste. BERGMANN [1] arbeitet mit den sogen. „Azlactonen" von der Formel



diese liefern mit Aminosäuren acetylierte Peptide, aus denen durch Abspaltung des Acetylrestes freie Peptide entstehen. Hervorzuheben ist, daß auf diese Weise die Carboxylgruppe des Phenylalanins, was sonst schwierig ist, sich leicht mit der Aminogruppe von Aminosäuren verknüpfen läßt und daß unter letzteren auch kompliziertere wie das Arginin glatt reagieren, wie das bei anderen Verfahren unmöglich ist. Allerdings liegen bis jetzt nur Erfahrungen über die Synthese phenylalaninhaltiger Dipeptide vor, wie das auch bei der von WESSELY[2] angegebenen Methode der Fall ist: N-Carbonsäureanhydride der Aminosäuren kuppeln mit anderen Aminosäuren unter CO_2-Abspaltung zu Dipeptiden:



---

1) M. BERGMANN u. F.STERN, Ann. 448, 20 (1926); M.BERGMANN, F.STERN u. CH.WITTE, l.c.; M.BERGMANN u. H. KÖSTER, l.c.

2) F.WESSELY, H. 146, 72 (1925); ferner F,SIGMUND u. F.WESSELY, H. 157, 91 (1926).

Die Arbeitsweise R.SCHÖNHEIMERs[1], der von toluolsulfonierten Aminosäurechloriden ausgeht und aus den erhaltenen Acylderivaten die Peptide durch Abspaltung von Tolylmercaptan mit Jodwasserstoff und Phosphoniumjodid in Freiheit setzt, ist nur an Glykokoll, Alanin und Leucin erprobt.

Schließlich müssen noch zwei ältere Synthesen von Benzoylpeptiden erwähnt werden. Die eine stammt von MOHR und STROSCHEIN[2] und geht von den sogen. „Lactimonen" aus. Das sind die BERGMANNs Azlactonen entsprechenden Benzoylderivate, die ganz wie die Azlactone angewandt werden können und schließlich noch die Vorteile bieten, die oft Benzoylderivate bei präparativen Arbeiten vor den Acetylkörpern voraus haben. Die andere stammt von Th. CURTIUS[3]; sie bedient sich der Azide benzoylierter Aminosäuren und Peptide, die den Säurehalogeniden ähnlich reagieren:

$$C_6H_5\text{-}CO\text{-}NH\text{-}CH_2\text{-}CON_3 + NH_2\text{-}CH_2\text{-}CO_2C_2H_5 \longrightarrow N_3H +$$

$$C_6H_5\text{-}CO\text{-}NH\text{-}CH_2\text{-}CO\text{-}NH\text{-}CH_2\text{-}CO_2C_2H_5$$

An Stelle des Azides der Hippursäure kann das jeder benzoylierten Aminosäure oder Peptides, an Stelle des Aminosäureesters auch jeder Peptidester Verwendung finden. Diese Verknüpfungsart stellt besonders wegen der leichten Zugänglichkeit der Azide eine sehr fruchtbare Reaktion dar;. in diesem Sinne dürfte sie an umfassen-

---

1) H. 154, 203 (1926).
2) B. 42, 2521 (1902).
3) B. 35, 3226 (1902); J.f.pr.Ch. (2), 70, 57, 73 89, 109, 137, 158, 195, 223 (1904).

der Ausdehnung sogar der Anwendung von Säurechloriden überlegen sein. Auch ist bei der Verwendung optisch aktiver Aminosäuren keine Änderung des Drehungssinnes zu befürchten, da Substitutionen am asymetrischen C-Atom nicht erfolgen, wie dies bei Anwendung von halogen-substituierten Säurechloriden der Fall ist. Ferner kann es als ein präpäarativer Vorteil der Azidmethode betrachtet werden, daß bei der Einwirkung des Azids auf den Aminosäureester der gesamte Stickstoffwasserstoff als solcher in Freiheit gesetzt wird, während bei Anwendung des Chlorids die Hälfte des angewandten Aminosäureesters der Reaktion als Chlorhydrat entzogen wird. Leider hat die elegante Methode mit der von MOHR und STROSCHEIN den Nachteil, daß sich der Benzoylrest, der dem Eiweißmolekül fremd ist, nicht ohne Verletzung der Peptidbindung abspalten läßt. Die beiden schönen Verfahren haben daher, obwohl schon lange bekannt, keine Verwendung zur Peptidsynthese gefunden und es dürfte eine nennenswerte Bereicherung unserer präparativen Methoden bedeuten, wenn es gelingen sollte mit Hilfe des Histozyms wenigstens die Derivate benzoylfrei zu erhalten, die aus natürlich vorkommenden Aminosäuren aufgebaut sind und deren Erforschung unsfür die Kenntnis der Eiweißstoffe und der eiweißspaltenden Enzyme in erster Linie nötig ist. Selbstverständliche Voraussetzung ist die Möglichkeit enzymatisch einheitliches, vor allem proteasenfreies Histozym herzustellen.

Die zur S p a l t u n g r a c e m i s c h e r

Aminosäuren wichtigste Methode[1] bedient sich der fraktionierten Kristallisation mit optisch aktiven Basen. Nach E.FISCHER ist das allerdings erst dann möglich, wenn jene in Form ihrer Benzoyl- oder Formylverbindungen als stärkere Säuren vorliegen. Aus den im vorhergehenden Abschnitt (S.8)genannten Gründen stößt daher die Anwendung des Verfahrens bei racemischen Peptiden auf Schwierigkeit. Eine einfache Möglichkeit liegt nun in der Ausnützung der optischen Spezifität des Histozyms: man benzoyliert das racemische Gemisch und läßt Histozym darauf einwirken; die Trennung der benzoylierten Komponente von ihrem durch das Ferment in Freiheit gesetzten Antipoden müßte wegen des verschiedenen Löslichkeitsverhaltens leicht sein. Das Verfahren hat schon C. HOPPERT[2] für Aminosäuren empfohlen. Für Peptide ergibt sich die Untersuchung der interessanten Frage, ob nur die unmittelbar mit dem Acylrest verbundene, oder auch entferntere Komponenten von Einfluß sind, ob z.B. ein racemisches Gemisch von Benzoyl-d, l-phenylalanyl-d, l-glutaminsäure zu 25% oder zu 50% gespalten wird. Für die oben erwähnten Versuche mit Aminosäuren genügte die Anwendung roher Enzymlösungen; für die Ausdehnung der Methode auf Peptidracemate ist es aber unbedingt nötig, das Histozym rein von den Proteasen darzustellen, die es in seinem natürlichen Vorkommen ständig begleiten.

Bei den Forschungen auf dem Gebiete der enzymatischen Proteinspaltung hat es sich in letzter Zeit immer

---

1) PASTEUR, C.R. 26, 535; 27, 360, 401 (1848)
E. FISCHER, Proteine usw. I, 4.

2) Bio. 149, 516 (1924)

notwendiger gezeigt, die Anzahl der bei einer proteolytischen Spaltung gebildeten Carboxylgruppen mit der Zahl der gleichzeitig freigelegten Aminogruppen zu vergleichen, da man dadurch gewisse Aufschlüsse über die Art der durch die Enzymwirkung geöffneten Bindungen[1] erhalten kann. Während die gebildeten Carboxylgruppen direkt und genau alkalimetrisch titriert werden können, am besten unter Zusatz von Alkohol nach R. WILLSTÄTTER und E. WALDSCHMIDT-LEITZ[2], hatte man zur Bestimmung der Aminogruppen bisher nur van SYLKEs[3] Methode zur Verfügung, durch die aber die Guanidingruppe des Arginins und die ε-Amino-/
/-Gruppe von Diaminosäuren wie Lysin nicht erfaßt werden. Nun kann es bei gleichzeitiger Anwesenheit von Oxyaminosäuren wie Serin vorkommen, daß bei der Proteolyse ein überwiegendes Auftreten von Carboxyl- gegenüber Aminogruppen beobachtet wird und man entscheiden muß, ob eine Esterbindung oder eine Peptidbindung, an der ein nach van SYLKE nicht erfaßbare Aminogruppe beteiligt ist, gelöst wurde. Ein Verfahren zur Beurteilung dieser Frage ließe sich darauf gründen, daß man zu Beginn und am Ende der Proteolyse das Verdauungsgemisch benzoyliert und den Zuwachs an freier Benzoesäure mißt, der bewirkt wird durch den Einsatz einmal von reiner Esterase, das andere Mal von reinem Histozym, das ja nach den von M. NENKI[4] wie

---

1) E.WALDSCHMIDT-LEITZ, Koll.Z. XL, 295 (1926); H.STEUDEL u. I.ELLINGHAUS, H.166, 84 (1927); H.STEUDEL u.A.GOTTSCHALK H.154, 98 (1926). - A.KOSSEL, H.84 1 (1913); K.FELIX, H.120, 97; 146, 110; 165, 108 (1926).

2) B. 54, 2988 (1921).

3) Jl. of Biol.Ch. 12, 275 (1912).

4) l.c.

auch in dieser Arbeit [1] gemachten Erfahrungen nur N- nicht aber O-gebundenes Benzoyl abspaltet.

Es ist offenbar, daß für diesen analytischen Zweck ebenso wie für die oben genannten präparativen Operationen das Histozym frei sein muß von Esterase und von Erepsin; so ist denn das Ziel dieser Arbeit die Herstellung von enzymatisch einheitlichem Histozym und es beschäftigt sich der Hauptteil (Teil III) mit der Untersuchung der Adsorptionseigenschaften des Histozyms im Hinblick auf seine Trennung von Erepsin und Esterase; vorausgehen Studien über die wichtigsten Eigenschaften des Histozyms (Teil II A), der Nierenproteasen (Teil II B) und der Nierenesterase (Teil II C), soweit sie zur Erkennung, Messung und Beschreibung der Enzyme nötig sind. Wenn schließlich in einem IV. Teil von der Spezifität des Histozyms die Rede ist, so sollen nur Tatsachen erörtert werden, wie sie im Laufe dieser Arbeit anfielen; die ausführbare Untersuchung der Spezifität soll ebenso wie die über die analytische und präparative Verwendung des Enzyms einer späteren Untersuchung vorbehalten bleiben.

---

1) Teil IV dieser Arbeit. (Tabelle 26).

II.

A. Erkennung, Messung und Beschreibung des Histozyms.

1. Ausgangsmaterial. Herstellung der Enzymlösungen. Löslichkeit des Histozyms.

Die Wahl des Ausgangsmaterials erfolgte auf Grund der Erfahrungen von R.WILLSTÄTTER, E.WALDSCHMIDT-LEITZ und J. GRASER[1], nach denen das Vorkommen am beträchtlichsten in der Niere ist, wobei das Enzym aus Pferdeniere gar nicht, aus Schweineniere nur teilweise, aus Hundeniere aber vollständig löslich ist in wässrigen Mitteln und Glycerin. Hundenieren konnten in frischem Zustand aus der hiesigen Tierärztlichen Hochschule dank dem Entgegenkommen des Herrn Geheimrat Prof.Dr.SCHMIDT bezogen werden.

Als Lösungsmittel kommt nur Glycerin in Betracht, das nicht nur reinere Lösungen liefert, sondern auch stabilisierend wirkt. Nach den Erfahrungen mit Pankreas- und Leberenzymen[2] lag es nahe zur Extraktion Trockenpräparate der Organe zu verwenden, da sie reinere Lösungen liefern als Rohorgane. Es mußte aber leider die Erfahrung gemacht werden, daß durch die Behandlung sowohl mit Alkohol-Äther als auch mit Aceton-Äther das Enzym u n l ö s l i c h wurde in Glycerin, in Wasser, in verdünnten Säuren und Alkalien (Tabelle 1). Im Zusammenhang damit werden wohl die oben mitgeteilten Befunde über die abweichende Löslichkeit der Enzyme verschiedener Herkunft

---

1) l.c.

2) R.WILLSTÄTTER u. E.WALDSCHMIDT-LEITZ, H. 125, 150 (1923).

nicht mit der Annahme verschiedener enzymatischer Inviduen, sondern mit einer verschieden festen Bindung des Enzyms an unlösliche Begleitstoffe zu deuten sein.

Die Extraktion der Frischnieren mit Glycerin lieferte stark rot gefärbte Lösungen mit gutem Histozymgehalt, der sich auch im Verlauf von Monaten nicht wesentlich verminderte.

Beispiel 1: Die Nieren wurden dem Hunde sofort nach der Tötung entnommen und gegebenenfalls bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelegt. Nach grober Reinigung von Fett wurden sie durch die Maschine gedreht, ein Gewichtsteil Brei zweimal mit je 2 Volumenteilen Aceton(bezw.Alkohol),einmal mit einer Mischung von 1 Teil Aceton(Alkohol) und 1 Teil Äther, 2 mal mit je 2 Teilen Äther extrahiert. Das getrocknete hellbraune Material wird verrieben oder gemahlen und durch das Sieb in einen feinpulvrigen und einen grobfaserigen Anteil zerlegt.

Je 1 g von dem Alkohol-Äther-(I) und von dem Aceton-Äther-Präparat(II) wurden 2 Stunden bei 30° extrahiert: mit 5 ccm 87 %igem(a),mit 20 ccm 29%igemGlycerin(b); mit 20 ccm Wasser ohne Zusatz(c),unter Zusatz einiger Tropfen n/10 Essigsäure bis zum p_H=6,0(d), von einigen Tropfen n/1 NH_3 bis zum p_H=ca.7,8(e); mit 20 ccm einer Mischung von 1 Teil Glycerin und 2 Teil n/40 Ammoniak (f), von 1 Teil Glycerin und 2 Teil n/10 Essigsäure (g). In diesen Extrakten und in dem feinen(h) und grobem(i) Trockenpulver wurde nach einem später näher zu beschreibenden Verfahren(II A 2)die Wirksamkeit durch Messung der aus Hippursäure abgespaltenen Benzoesäure bestimmt.

Tabelle 1

Wirksamkeit der Nierentrockenpräparate und der daraus gewonnenen Extrakte.

5 ccm 2-n Natriumhippurat, 2 ccm 1-n Natriumacetat; Gesamtglyceringehalt 16%; Gesamtvolumen 25 ccm; 24 Stunden; 30°. Extrakte zur Bestimmung neutralisiert.

Nr.	Extrakt ccm	Trockenpulver gr	abgespaltene Benzoesäure ccm n-10
I a	4	(0,8)	0,06
II a	4	(0,8)	0,10
b	12	(0,6)	0,10
c	12 H_2O	(0,6)	0,20
d	12	(0,6)	0,05
e	12	(0,6)	0,00
f	12	(0,6)	0,02
g	12	(0,6)	0,00
h	— 1)	1,0	7,65
i	— 2)	1,0	0,50

1) fein.Pulv.
2) grob.Pulv.

Beispiel 2: Frische Nieren werden gereinigt und durch die Maschine getrieben. Ein Gewichtsteil Brei wird mit 3 Volumteilen 87%igem Glycerin unter häufigem Umschütteln mindestens 2 Stunden bei 30° extrahiert und die stark rot gefärbte Lösung auf einer schnellen Zentrifuge vom Ungelösten getrennt. Die Bestimmung der Wirksamkeit wie in Beispiel 1 a) sofort, b) nach 8 Tagen, c) nach 3 Monaten, d) nach 9 Monaten, e) sofort nach 2-maligem Filtrieren durch Filtrierpapier ergab für 3 ccm Extrakt folgende Spaltungswerte in ccm n/10 Benzoesäure:
a) 1,70 b) 1,50 c) 1,50 d) 1,40 e) 1,70.

Die Haltbarkeit der Lösungen ist gut. Durch Filtrieren tritt kein Enzymverlust ein; die von N.MUTCH[1)] an Lösungen aus Schweinenieren beobachtete bedeutende Einbuße an Histozym beim Filtrieren dürfte auf Adsorption des Enzyms an kolloidal gelöste Begleitstoffe zurückzuführen sein, die beim Filtrieren zurückgehalten werden.

2. Untersuchungsmethode.

Die für die Wirksamkeit des Histozyms charakteristische Spaltung der Hippursäure verläuft nach der Gleichung:

$$C_6H_5.CO.NH.CH_2.CO_2H + H_2O = C_6H_5CO_2H + NH_2.CH_2.CO_2H$$

Aus 1 Äquivalent einer starken Säure entstehen 1 Äquivalent einer starken Säure + 1 Äquivalent einer amphoteren Aminosäure, außerdem wird eine Aminogruppe freigelegt. Die Reaktion könnte also verfolgt werden durch alkoholische Titration nach R.WILLSTÄTTER und E.WALDSCHMIDT-LEITZ, durch die Formoltitration nach SÖRENSEN oder auch durch die Methode von D.D.van SLYKE,

---

1) l.c.

die A.W.DOX[1] für diesen Zweck benutzt hat. Da aber durch diese drei Methoden auch proteolytische Vorgänge mit erfaßt werden, verdient ein anderes für die Histozymwirkung spezifischeres Verfahren den Vorzug und als solches wurde schon immer gerne die Bestimmung der mit geeigneten organischen Lösungsmitteln aus dem Reaktionsgemisch abgetrennten Benzoesäure angewandt. N.MUTCH[2] und I.A.SMORODINZEW[3] wägen die mit Petroläther ausgeschüttelte Benzoesäure. Nach dem neuerdings von E.M.P.WIDMARCK[4] ausgearbeiteten „Schaukelextraktionsverfahren" wird die Benzoesäure aus dem Reaktionsgemisch in Toluol und von da in Natronlauge übergeführt. Die Extraktion dauert lange, 15 Stunden, bis sie quantitativ ist ; daran ist schuld der zweimalige Übergang von einer Phase in die andere und die schlechte Vermischung des Toluols mit den wässerigen Medien. Um durch die Methode bedingte Fehler zu vermeiden: Entstehung von Säure durch die lange Einwirkung der Lauge auf das Toluol, Aufnahme von Kohlensäure, sind schließlich noch zeitraubende Operationen nötig, bis endlich die Benzoesäure titriert werden kann. In dieser Arbeit finden Rapidextraktoren mit Rührwerk Verwendung; die Extraktion ist bei genügender Destillations- und Rührgeschwindigkeit in 3 bis 4 Stunden beendet, die Bestimmung der Benzoesäure

---

1) l.c.
2) l.c.
3) l.c.
4) Bio. 179, 263 (1926).

geschieht im Siedekolben des Extraktors, in dem zur Petrolätherlösung das gleiche Volumen 96%iger Alkohol und 2 ccm 0,5 %ige Thymolphtaleinlösung hinzugefügt werden und mit n/10 alkoholischer Lauge auf Blau titriert wird. Der Umschlag ist äußerst scharf mit 0,02 ccm n/10 Lauge.

Prüfung der Extraktionsapparatur: Eine Lösung von 5 ccm 2/5 n Kaliumbenzoat, 5 ccm 2/5 n Kaliumhippurat, 2 ccm n/1 Natriumacetat wurden mit 4 ccm eines Glycerinextraktes aus Rohnieren und dann mit 20 ccm 2 n-Schwefelsäure versetzt; dabei fiel die Hippursäure aus vermengt mit organischen Stoffen aus dem Nierenextrakt; jeder der vier Extraktoren wurde mit einer solchen Mischung beschickt und 4 Stunden extrahiert mit Petroläther. Zur Titration wurden verbraucht bei Extraktor Nr.1: 9,95 ; Nr. 2: 9,90; Nr. 3: 9,97 ; Nr. 4: 10,0 ccm n/5-Lauge (ber. 10,0).

3. Einfluß der Wasserstoffjonenkonzentration auf die Histozymwirkung .

Seit den Untersuchungen von S.P.L. SÖRENSEN[1] und L.MICHAELIS[2] wird der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Enzymwirkung allgemein beachtet und besonders das optimale p_H zur Kennzeichnung eines Enzyms herangezogen. Weitergehende Schlüsse aus letzterem zu ziehen z.B. in Bezug auf Gleichheit oder Verschiedenheit von Fermenten, in unserem Falle von Histozym und Proteasen, ist nicht möglich; hat es sich doch gezeigt, daß das Erepsin der Hefe und das der Verdauungssekrete bei gleichem optimalen p_H verschieden

---

1) Bic. 21, 131 (1909).
2) L.MICHAELIS u. DAVIDSOHN, Bio. 35, 386 (1911).

sind[1]. Umgekehrt kann bei einem und demselben Enzym das optimale p_H verschieden liegen, bei gewissen pflanzlichen Proteasen[2] wird es von den Substraten beeinflußt und zwar stimmt es mit deren isoelektrischem Punkte überein. Für vergleichende Messungen: Zur Gehaltsbestimmung von Enzymlösungen, zur Beurteilung von Reinigungs- und Trennungsoperationen, ist es natürlich nötig den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration zu kennen und zu regulieren.

Die p_H-Abhängigkeit des Histozyms ist noch nicht untersucht. N.MUTCH[3] und I.A.SMORODINZEW[4] arbeiteten mit neutralen Natriumhippuratlösungen; die Acidität der Enzymlösungen wurde nicht beachtet. E.ABDERHALDEN[5] findet keine Einwirkung von Nierenpreßsaft auf freie Hippursäure - nach meiner Erfahrung dürfte das p_H nicht alkalischer als 3,7 gewesen sein.

Für die folgenden Versuche wurde für die Hippurat- und Enzymlösungen in Vorproben die Säure- bezw. Alkalimenge ermittelt, die nötig war, um sie auf das gewünschte p_H zu bringen; ebenso für den Ammonsalz-Citrat-Phosphatpuffer, der nach den Angaben von R.WILLSTÄTTER und W.GRASSMANN[6] hergestellt, für die Versuche von Tabelle 2 Verwendung fand; als Puffer für die Versuche zu Tabelle 3 dienten Mischungen von primärem und sekundärem n/5 Phosphat nach SÖRENSEN. Das Ein-

---

1) W.GRASSMANN, H. 167, 204 (1927).
2) R.WILLSTÄTTER, W.GRASSMANN u. O.AMBROS, H. 151, 307 (1925/26)
3) l.c. 4) l.c.
5) E.ABDERHALDEN u. Y.TERUUCHI, H. 49, 6 (1906).
6) H. 153, 256 (1926).

stellen einer bestimmten Wasserstoffionenkonzentration geschah nach der Indikatorenmethode.

Tabelle 2.

Spaltungsgeschwindigkeit und p_H (4,4 bis 8,5).

Ansatz: 5 ccm 2/5 n-K-Hippurat; 2 ccm Citratphosphatpuffer; 8 ccm Enzymlösung III; Säure bezw. Lauge nach Angabe; Gesamtvolumen 16 ccm. 2 ccm Toluol. 30°. 24 Stdn. +)

Zusatz	p_H	Spaltung Benzoesäure ccm n/5
0,42 ccm n/1 HCl	4,4	0,08
0,1 ccm n/10 HCl	5,0	0,12
0,04 ccm n/10 HCl	5,8	0,20
0,2 ccm n/10 KOH	6,4	0,45
1,05 ccm n/10 KOH	8,5	0,22

+) Am Schluß der Reaktionszeit wurde mit 20 ccm 2 n-H_2SO_4 gestoppt und dann extrahiert.

Tabelle 3.

Spaltung und p_H (5,9 - 7,8)

Ansatz: 5 ccm 2/5 n-K-Hippurat; 2 ccm Phosphatgemisch; 8 ccm Enzymlösung V; Lauge nach Angabe; Wasser bis zum Gesamtvolumen von 23 ccm; 2 ccm Toluol; 30°; 40 Stdn.+)

Zusatz n/10 KOH ccm	p_H des Puffers	p_H des Ansatzes ± 0,1	Spaltung Benzoesäure n/5 ccm
0,05	6,1	5,9	1,10
0,10	6,4	6,2	1,28
0,20	6,7	6,5	1,82
0,25	7,0	6,8	2,14
0,30	7,3	7,1	2,70
0,40	7,7	7,4	2,50
0,45	8,0	7,6	2,47
0,50	8,3	7,8	2,20

Aus Tabelle 3 ergibt sich für das Histozym ein

scharfes Optimum bei p_H = 7,1 (± 0,1), mit steilerem Abfall der Kurve nach der saueren Seite.

4. Beeinflussung der Histozymwirkung durch Zusätze.

Für die Charakterisierung eines Enzyms, für seine präparative Verwendung wie auch für die Ausarbeitung einer Bestimmungsmethode ist es unerläßlich sich über den aktivierenden oder hemmenden Einfluß natürlicher Begleitstoffe oder künstlicher Zusätze zu unterrichten. Insbesondere das Studium der Hemmungserscheinungen hat in letzter Zeit bemerkenswerte Anhaltspunkte über die Natur bestimmter Fermentreaktionen ergeben[1].

N.MUTCH[2] untersuchte die Beeinflussung der fermentativen Hippursäurespaltung durch die Reaktionsprodukte; er fand Hemmung durch Benzoesäure, nicht aber durch Glykokoll und folgerte daraus Affinität des Histozyms zum Benzoylrest, ganz allgemein zu aromatischen Gruppen. Die experimentellen Grundlagen für diesen Schluß sind heute allerdings unzureichend; kennen wir doch seit den Arbeiten von L.MICHAELIS[3] zwei Gruppen von Hemmungskörpern, unterscheidbar durch die Untersuchung ihres Einflusses auf die Aktivitäts-p_S-Kurven: solche, die mit dem Substrat in eine Konkurrenz um das

---

1) L.MICHAELIS u. M.MENTEN, Bio. 49, 333 (1913)
R.KUHN, H.129, 57 (1923).
K.JOSEPHSON u. H.v.EULER, H. 162, 85 (1926)

2) l.c.

3) L. MICHAELIS u. P.RONA, Bio. 60, 62 (1914)
L. MICHAELIS u. H.PECHSTEIN, Bio. 60, 79 (1914).

Enzym treten und solche, die nur die Zerfallsgeschwindigkeit der Enzym-Substrat-Zwischenverbindung beeinflussen.

Aus Tabelle 4 ergibt sich, daß unter den dort angegebenen Bedingungen nicht nur Benzoesäure (Nr.8), sondern auch Glykokoll (Nr. 9) hemmend wirkt. Der abweichende Befund von N.MUTCH läßt sich so erklären, daß das Enzym aus Schweineniere schon in dieser Beziehung maximal gehemmt ist durch natürliche, dem Glykokoll ähnlich wirkende Begleitstoffe. Reaktionsverzögernd wirken ferner noch Glycerin (Nr. 2 und 4), Phosphat (Nr. 6 und 7), Ammoniumchlorid (Nr. 12), Natriumsulfit (Nr. 14), fast vollkommen inaktivierend Sublimat (Nr.15) und Kaliumcyanid (Nr. 13).

K.JOSEPHSON und H.v.EULER haben aus der Hemmung des Darmerepsins durch Blausäure, Sulfit, Phenylhydrazin auf eine Aldehydnatur der aktiven Gruppe des Erepsins geschlossen. Das Auftreten ähnlicher Erscheinungen beim Histozym ist mit Vorsicht zu beurteilen. Abgesehen davon, daß der dreifach gebundene Stickstoff der Blausäure, das ungesättigte S-Atom des Sulfits, das additionsfähige N-Atom des Phenylhydrazins auch andere Deutungen zulassen, ist erst nachzuweisen, ob wirklich eine Affinitätsbeanspruchung des Enzyms durch die Hemmungskörper vorliegt oder ob diese das Substrat oder Zwischenprodukte des enzymatischen Vorgangs in einen reaktionsträgeren Zustand überführen. Außerdem ist die später [2]

1) l.c.
2) Teil III B 16 b dieser Arbeit.

noch näher zu beschreibende Tatsache zu berücksichtigen, daß Histozym durch Kaolin, ein saures Adsorbens, aufgenommen wird unter reversibler Inaktivierung, also Blockierung der spezifischen Gruppe des Enzyms.

Tabelle 4.

(Seite 22)

Tabelle 4.

Ansatz für Nr.1 u. 2: 5 ccm K-Hippurat 2/5 n; 8 ccm Enzymlösung III; 2 ccm Natriumacetat; 8 ccm Wasser (Nr.1) bezw. 8 ccm 87 %iges Glycerin (Nr.2); Gesamtvol. 23 ccm. 2 ccm Toluol. 30°.
Nr.3 u.4: 5 ccm 2/5 n-Hippurat; 8 ccm Enzymlösung VI; 0,30 ccm n/10 KOH; 2 ccm Phosphatpuffer (pH = 7,1); Zusatz nach Angabe; Gesamtvol. 50 ccm. 2 ccm Toluol. 30°.
Nr. 5 bis 10: 5 ccm n/1 K-Hippurat; 1/2 ccm Natriumacetat; 3 ccm Enzymlösung X ; 1 ccm 87 %iges Glycerin; 0,45 ccm n/10 KOH; Zusatz nach Angabe; Gesamtvolumen 25 ccm; 2 ccm Toluol; 30°.
Nr. 11 bis 15: 5 ccm n/1 K-Hippurat; 1 ccm Phosphatpuffer (pH = 7,1); 3 ccm Enzymlösung X; 1 ccm Glycerin; Zusatz nach Angabe; Säure und Lauge zur Einstellung der Zusätze auf pH 7,1. Gesamtvol. 25 ccm. 2 ccm Toluol. 30°.

Nr.	Zusatz	Zeit Stdn.	Säure ccm n/10	Spaltung %	Hemmung %
1	- -	38	4,06	20,0	--
2	8 ccm Glycerin	38	1,40	7,0	70
3	- -	48	3,80	19	--
4	8 ccm Glycerin	48	2,44	12,2	28
5	- -	24	4,20	8,4	--
6	1 ccm Phosphatpuffer pH = 7,1	24	3,00	6,0	29
7	2 ccm " "	24	2,40	4,8	43
8	5 ccm 2/5 n-K-Benzoat	24	3,25++)	6,5	23
9	10 ccm m/5 Glykokoll	24	3,55	7,1	15,5
10	0,8 g $CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	24	1,90	3,8	55
11	- -	24	3,00	6,0	--
12	2 ccm 2,5 n-NH_4Cl	24	2,63	5,26	12
13	5 ccm 0,13 m-KCN	24	0,1	0,2	97
14	5 ccm 0,3 m-Na_2SO_3	24	1,0	2,0	67
15	2,5 ccm 1 %ige $HgCl_2$-Lösung	24	0,02	0,04	99,5

+) Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde mit 20 ccm 2 n-H_2SO_4 unterbrochen und dann mit Petroläther extrahiert.

++) Nach Abzug der zugesetzten Benzoesäure.

5. Kinetik des Histozyms.

Aus Tabelle 5 geht hervor, daß in der ersten Hälfte des untersuchten Bereiches der absolute Umsatz nach Art monomolekularer Reaktionen proportional ist der Substratkonzentration, um dann weiterhin langsamer als diese anzusteigen - eine Erscheinung, die aus früheren Untersuchungen über Laktase [1], Trypsin[2] und Saccharase[3] bekannt, theoretisch aber noch nicht aufgeklärt ist[4].

Die Versuche, deren Ergebnisse Tabelle 6 wiedergibt, sollen für eine praktische Enzymbestimmung den Zusammenhang zwischen Enzymmenge und Reaktionsgeschwindigkeit zeigen; zur Erhöhung des Ausschlages wurde mit großer Substratkonzentration gearbeitet. Die für eine monomolekulare Reaktion berechnete Konstante fällt mit steigender Spaltung. Wenn N.MUTCH[5] bis zu einer Spaltung von 80 % annähernd lineare Reaktion beobachtet, so wurde schon bei Besprechung der Löslichkeit und Hemmbarkeit des Histozyms darauf hingewiesen, daß es MUTCH mit einem anderen wahrscheinlich heterogenen Reaktionssystem zu tun hatte.

In Tabelle 7 finden wir die Zeiten gleiches Umsatzes noch innerhalb der Fehlergrenzen umgekehrt proportional den angewandten Enzymmengen, solange

---

1) ARMSTRONG, Proc.roy.soc. 73, 509 (1904).
2) S.G.HEDIN, J.of Physiol. 32, 476 (1905).
3) I.BROWN, Trans.Chem.Soc. 81. 387 (1902)
H.v.EULER u. LAURIN, H. 110, 55 (1920).
4) S.G.HEDIN, H. 146, 122 (1925); 154, 252 (1926);
vgl. dagegen K.JOSEPHSON, H.147, 55 (1925).
R.KUHN u.H.MÜNCH, H. 163, 3 (1927).
5) l.c.

eine Reaktionszeit von 2 Tagen nicht überschritten wird. Im allgemeinen zeigen die Spaltungen für das gleiche Produkt E x t fallende Tendenz mit abnehmender Enzymmenge.

Tabelle 5.

Substratkonzentration und Umsatz.

2/5 n-K-Hippurat nach Angabe; 8 ccm Enzymlösung VI; 0,3 ccm n/10 KOH; 2 ccm Phosphatgemisch vom p_H= 7,1; Gesamtvol. 50 ccm. 2 ccm Toluol. 30°. 21 Stunden.

2/5 n-K-Hipp. ccm	Säure ccm n/5	Spaltung %	$K = \frac{1}{t} \cdot \ln \frac{a}{a-x}$
5	0,80	8	0,0040
12,5	1,95	7,8	0,0039
25	2,90	5,8	0,0028

Tabelle 6.

Enzymmenge und Umsatz.

Ansatz: 10 ccm n/1-K-Hippurat; 2 ccm Phosphatgemisch vom p_H = 7,1; Enzymmenge nach Angabe; wechselnde Mengen n/10 KOH, um Enzym und Substrat auf das Versuchs-p_H zu bringen. Glyceringehalt im ganzen 16%; Wasser bis zu einem Gesamtvol. v. 50 ccm; 2 ccm Toluol. 30°. Zeit nach Angabe.

Enzymlsg. ccm	8			4			2		
Zeit Stunden	a	b	c	a	b	c	a	b	c
24	2,95	5,90	–	1,70	3,40	144	0,88	1,76	74,0
48	–	–	–	3,00	6,00	129	1,60	3,20	67,7
96	–	–	–	–	–	–	2,65	5,30	56,7
192	–	–	–	–	–	–	–	–	–

a = ccm n/5 Säure Spaltung
b = % Spaltung
c = $k \cdot 10^5$ (k = monomolekulare Konstante).

Tabelle 6 (Fortsetzung).

nzymlsg. ccm.	1			1/2			1/4			1/8		
Zeit tunden	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
24	0,44	0,88	36,8	–	–	–	–	–	–	–	–	–
48	0,81	1,62	34,0	0,45	0,90	18,9	–	–	–	–	–	–
96	1,50	3,0	31,7	0,7	1,4	14,7	0,3	0,6	6,3	–	–	–
92	2,42	4,84	25,9	1,10	2,20	11,6	0,37	0,74	3,9	0,17	0,34	–

a = ccm n/5 Säure Spaltung
b = % Spaltung
c = $k \cdot 10^5$ (k = monomolekulare Konstante).

Tabelle 7.

Enzym-Zeit-Gesetz.

E = ccm Enzymlösung VI; t = Tag.

Ferment-menge (E)	E·t = 8	4	2	1
	Spaltung ccm n/5 Benzoesäure			
8	2,95	–	–	–
4	3,00	1,70	–	–
2	2,65	1,60	0,88	–
1	2,42	1,50	0,81	0,44
1/2	–	1,10	0,70	0,45
1/4	–	–	0,37	0,30
1/8	–	–	–	0,17

6. Bestimmungsmethode. Enzymeinheiten.

Der Bestimmung des Histozyms wird seine Einwirkung auf Hippursäure beim optimalen p_H von 7,1 zugrundegelegt; verfolgt wird diese durch Messung der freigelegten Benzoesäure nach der früher beschriebenen (II A 2) Methode. Der Gehalt des Bestimmungsansatzes an Glycerin (Enzymlösung) und Phosphat (Puffer!) ist wegen der stark hemmenden Wirkung dieser Stoffe stets genau in der einmal festgelegten Höhe zu bemessen. Die Menge des Phosphatpuffers kann niedrig gehalten werden, da die nach der Gleichung :

$$C_6H_5CO\text{-}NH\text{-}CH_2\text{-}CO_2Na \quad = \quad C_6H_5CO_2Na \; + \; NH_2\text{-}CH_2\text{-}CO_2H$$

entstehenden Reaktionsprodukte die Acidität unter den angegebenen Bedingungen nicht wesentlich ändern.

Ausführung (1): Zu 10 ccm m/1 Natriumhippurat-[+)] lösung und 2 ccm m/5 Phosphatgemisch vom p_H = 7,1 gibt man die meist glycerinhaltige Enzymlösung und die in einem Vorversuch ermittelte Menge Säure oder Lauge, die nötig ist, um Enzymlösung und gegebenenfalls auch Hippuratlösung auf das gewünschte p_H zu bringen; dann soviel Glycerin, daß nach Auffüllen mit Wasser auf 50 ccm im Ganzen ein Gehalt von 16% erreicht wird. Nach Zugabe von 2 ccm Toluol wird bei 30° aufbewahrt, am Ende der Reaktionszeit - gewöhnlich 24, 48 oder 96 Stunden - mit 10 ccm 2 n-Schwefelsäure gestoppt, mit Petroläther extrahiert und nach Zusatz von einer der

---

+) Sh. die Bestimmungen auf S. 24 u. vorher.

Petrolätherlösung gleichen Menge 96 %igen Alkohols und von 2 ccm einer 0,5 %igen alkoholischen Thymolphtaleinlösung mit alkoholischer n/5 KOH titriert.

Aus den so erhaltenen Spaltungswerten ermittelt man die zugehörigen Enzymeinheiten mit Hilfe der nach Tabelle 6 (Enzymmenge und Umsatz) durch Interpolation abgeleiteten Tabelle 8. Als „Histozymeinheit (H.-E.)" wird die Enzymmenge gewählt, die unter obigen Bedingungen in 24 Stunden eine Spaltung von 2 ccm n/5 Benzoesäure ergibt. Der „Histozym-Wert (H.-W.)", das Maß für die Enzymkonzentration, gibt die Anzahl H.-E. in 1 cgr. Enzympräparat an.

In Tabelle 8 ist noch eine veränderte Ausführungsart (2) der Bestimmung berücksichtigt, wie sie in einem späteren Teil der Arbeit zur Anwendung kam: 5 ccm m/1 Hippurat; 1 ccm Phosphatpuffer; Enzymlösung nach Angabe; Glyceringehalt insgesamt 16%; Wasser bis zum Gesamtvolumen von 25 ccm. Titriert wird mit n/10 alkoholischer Lauge.

Tabelle 8.

Spaltungswert und Enzymeinheit.

Spaltung: ccm[+] Benzoesäure in Stunden			Histozymeinheiten (H.-E.)	
24	48	96	Ausführung Nr. 1[+]	Ausführung Nr. 2[+]
0,21	0,40	0,69	0,1	0,05
0,42	0,78	1,40	0,2	0,10
0,63	1,14	2,10	0,3	0,15
0,84	1,54	2,59	0,4	0,20
1,04	1,94	-	0,5	0,25
1,24	2,32	-	0,6	0,3
1,43	2,63	-	0,7	0,35
1,62	2,90	-	0,8	0,40
1,81	3,15	-	0,9	0,45
2,00	3,37	-	1,0	0,50
2,17	-	-	1,1	0,55
2,34	-	-	1,2	0,6
2,48	-	-	1,3	0,65
2,62	-	-	1,4	0,70
2,75	-	-	1,5	0,75
2,87	-	-	1,6	0,80
2,97	-	-	1,7	0,85

+) Ausführung 1: ccm n/5 Benzoesäure; Gesamtvol. 50 ccm.

Ausführung 2: ccm n/10 Benzcesäure; Gesamtvol. 25 ccm.

B. Nierenproteasen.

1. Trypsin.

S.G.HEDIN[1], H.C.BRADLEY[2] und K.G.DERNBY[3] fanden in Pferde- und Rinderniere ein bei p_H = 4,3 bis 5,6 gegen Organeiweiß und Casein wirksames proteolytisches Enzym. Zur Untersuchung wurden verwandt teils Preßsäfte der Organe, teils Extrakte, die mit verdünnter Essigsäure, bezw. Casein- oder NaCl-Lösung hergestellt waren. Die in dieser Arbeit benützten Glycerinauszüge aus Hundenieren besitzen nach Tabelle 9 weder in schwach saurem noch in schwach alkalischem Medium eine bemerkenswerte tryptische Wirkung. Eine Identität des Histozyms mit der hinsichtlich ihrer Spezifität sonst noch wenig untersuchten Nierentryptase erscheint damit ausgeschlossen.

Tryptasegehalt der Nierenextrakte.

a) Einwirkung auf Casein bei p_H = 8,6.

Die Ausführung geschah im Sinne der von R.WILLSTÄTTER, E.WALDSCHMIDT-LEITZ, S.DUNAITURRIA und G.KÜNSTNER[4] gemachten Angaben zur Bestimmung des Pankreastrypsins.

Ansatz: 5 ccm 6 %ige Caseinlösung; 1 ccm 2,5 n-Ammoniak-Ammonchloridgemisch (1:1 ; p_H = 8,6 bei 30°); je 1 ccm Nierenextrakt III bezw. V und VI; Wasser bis zu einem Gesamtvol. von 10 ccm.

Zu Beginn, nach 6 und 24 Stunden (Reaktionstemperatur 30°) wurde die Acidität solcher Proben von 10 ccm bestimmt, indem man mit 5 ccm Wasser, 15 ccm 96 %igen Alkohol und 1/2 ccm 0,5 %iger alkoholischer Thymolphtaleinlösung vermischte, 0,2 n-alkoholische KOH bis zur kräftigen Blaufärbung zugab und nach

---

1) H. 32, 531 (1901); H. 122, 307 (1922).
2) Jl.of Biol.Ch. 52, 466 (1922).
3) Jl.of Biol.Ch. 35, 179 (1918).
4) H. 161, 191 (1926).

Entfärbung durch Zusatz von weiteren 120 ccm 96%igen Alkohols die Titration zu Ende führte.

Die in der folgenden Tabelle 9 angegebenen Spaltungswerte ergeben sich nach Abzug geringfügiger Beträge für die Selbstspaltung der Enzymlösung, die in eigenen Versuchen (Ansatz unter Wegfall des Subtrates wie oben) ermittelt wurde.

b) Einwirkung auf Gelatine bei $p_H = 4,7$.

Casein eignet sich hier nicht als Substrat wegen seiner Schwerlöslichkeit beim Versuchs-p_H. Ansatz: 5 ccm 6%iger Gelatinelösung; 1 ccm n/1-Essigsäure-Natriumacetatpuffer (1:1; $p_H = 4,7$); 1 ccm Nierenextrakt III oder V oder VI; Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 10 ccm.

Zu Beginn, nach 6 und 24 Stunden (Temperatur = 30°) werden 10 ccm-Proben mit 10 ccm heißem Alkohol versetzt und auf kräftiges Blau titriert, durch portionsweisen Zusatz von heißem Alkohol immer wieder entfärbt und wieder auf Blau titriert, bis bei einem Alkoholgehalt von 90% die Blaufärbung bestehen blieb.

Tabelle 9.

Tryptasegehalt der Nierenextrakte.

Enz-Lsg. Nr.	Substrat	p_H	Spaltung; ccm n/5 Säure in Stdn. 6	24
III	Casein	8,6	-	0,03
V	"	"	-	0,02
VI	"	"	-	0,04
III	Gelatine	4,7	-	-
V	"	"	-	-
VI	"	"	-	-

2. Nierenerepsin.

p_H=Optimum; Reaktionsverlauf; Bestimmungsmethode; Enzymeinheiten.

Den eindeutigen Nachweis von Erepsin in der Niere im Sinne unserer heutigen Kenntnisse über die Spezifität tierischer Proteasen[1] hat E.ABDERHALDEN[2] geführt, der Nierenpreßsaft auf reine Dipeptide einwirken ließ, während S.G.HEDINs[3] Feststellungen sich auf die Spaltung von Pepton-Witte bei schwach alkalischer Reaktion gründeten.

In der vorliegenden Arbeit wird allen Messungen die Einwirkung des Erepsins auf das schon von ABDERHALDEN, dann vor allem in den grundlegenden Arbeiten von E.WADDSCHMIDT-LEITZ angewandte Leucylglycin zugrundegelegt; der Vorgang wird verfolgt durch Titration der freigelegten Carboxylgruppen in alkoholischer Lösung nach R.WILLSTÄTTER und E.WALDSCHMIDT-LEITZ.

Die optimale Wasserstoffzahl ist für Nierenerepsin nach Tabelle 10 p_H= 7,8 in Übereinstimmung mit den für Pankreas-[4], Darm-[5], Milz-[6] und Hefeerepsin[7] ermittelten Werten. Phosphat- und Ammoniak-Ammonchloridpuffer erwiesen sich in den untersuchten Fällen als gleichwertig. (vgl.Tabelle 10, Nr.3 und 6,4, u.7 !)

---

1) E.WALDSCHMIDT-LEITZ u. A.HARTENECK, H.149, 203 (1925).

2) H. 48, 537; 49, 1 (1906).

3) H.122, 307 (1922)

4) E.WALDSCHMIDT-LEITZ u.A.SCHÄFFNER,H.151, 31 (1926).

5) E.WALDSCHMIDT-LEITZ u.A.HARTENECK,H.147,308 (1925).

6) E.WALDSCHMIDT-LEITZ u.W.DEUTSCH, l c.

7) R.WILLSTÄTTER u. W.GRASSMANN, H. 153, 263 (1926).

Die Ausführung der Bestimmung gestaltet sich folgendermaßen: 3,764 g d,l-Leucylglycin (= 0,02 Mol) werden in 40 ccm Ammoniak-Ammonchloridgemisch (1:1; n/1) und 40 ccm Wasser gelöst, dann 5 ccm n/1 Essigsäure zugefügt und mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt. Zu 12,5 ccm dieser Substratlösung gibt man 2,5 ccm Puffergemisch (NH_3 zu NH_4Cl = 1:16 ; 2,5 n; p_H = 7,8 bei 30°), Glycerin bis zu einem Gehalt von 20% unter Berücksichtigung des Glyceringehaltes anderer Zusätze (Enzymlösung !), die auf p_H = 7,8 eingestellte Enzymlösung und Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 25 ccm. Je nach der Zahl der Titrationsproben ist der Ansatz zu vervielfachen . Bei allen Versuchen, die länger als 8 Stunden laufen, wird durch Zusatz von Toluol bakterielle Einwirkung ausgeschlossen. Zu Beginn und am Ende der Bestimmungszeit, während der das Gemisch auf einer Temperatur von 30° gehalten wird, trägt man Proben derselben à 10 ccm in 90 ccm absoluten Äthylalkohol ein und titriert nach Zusatz von 2 ccm o,5%-iger alkoholischer Lösung von Thymolphtalein mit 90%ig-alkoholischer n/5-Lauge auf Blau. Nimmt man Titrationsproben von 5 oder noch weniger ccm, so titriert man mit n/10 bezw. entsprechend schwächerer Lauge.Die Differenz von Anfangs- und Endtitration ergibt die Menge der gebildeten Aminosäure.

Die Enzymwirkung kommt nach Tabelle 11 bei einer Spaltung von 50% des racemischen Substrates zum Stillstand; es ist ratsam die Hydrolyse nicht über 40% auszudehnen, da abgesehen von einer Verarmung an Substrat infolge asymetrischen Reaktionsverlaufes - die der Bestimmung zugrunde zu legende Beziehung $K_2 = \frac{1}{t} \cdot \lg \frac{2\,a}{2a - x}$ nicht mehr erfüllt

wird. Das p_H der Versuchslösung erfährt nach besonderen Versuchen im ganzen Verlaufe der Reaktion keine bemerkenswerte Änderung.

Berechnet man für die Einwirkung des Enzyms auf d,l-Leucylglycin die Konstante der monomolekularen Reaktion, indem man als aktive Masse die Konzentration des l-Leucylglycins, das allein dem Angriff des Enzyms unterliegt, in die Rechnung einführt, so ergibt sich nach Tabelle 11 und 12 ein ständiges Ansteigen der Konstante k_1, wie es etwa der Überlagerung einer logarithmischen und einer linearen Reaktion entspricht. Für die praktische Enzymbestimmung erhält man eine geeignete Beziehung, wenn man in die Formel der monomolekularen Reaktion die doppelte Menge der spaltbaren Peptidkomponente einsetzt. Der Wert $k_2 = \frac{1}{t} \cdot \lg \frac{2\,a}{2\,a-x}$ ist innerhalb der Fehlergrenzen konstant für ein und dieselbe Enzymmenge, und außerdem der angewandten Enzymmenge proportional (Tabelle 12) in dem untersuchten Bereiche der Enzymmengen wie 1:4.

Das Verhalten des Nierenerepsins unterscheidet sich damit von dem eines anderen Gewebserepsins dem der Milz[1]; sowie von dem Enzym der Hefe[2]; dagegen decken sich meine Befunde mit den von E.WALDSCHMIDT-LEITZ und A.HARTENECK[3] in einer Arbeit über das Pankreaserepsin mitgeteilten Beobachtungen. Zwecks Übereinstimmung mit den dort festgesetzten Maßen wird als „Nieren-Erepsin-Einheit (N.-Er.-E.)"

---

1) E.WALDSCHMIDT-LEITZ u. W.DEUTSCH, l.c.
2) R.WILLSTÄTTER u. W.GRASSMANN, l.c.
3) l.c.

das 1000-fache derjenigen Enzymmenge bezeichnet, für die sich unter den Bedingungen der Bestimmung die Konstante der monomolekularen Reaktion = 0,001 ergibt; die berechnete Reaktionskonstante einer Bestimmung gibt also zugleich den Gehalt der Titrationsprobe (10 ccm) an Nieren-Erepsin-Einheiten. Bei Titration mit n/10 Säure (5 ccm-Proben) ist zur Berechnung die Formel $k = \frac{1}{2t} \cdot \lg \frac{2a}{2a - x}$ zu verwenden. Für die Bestimmungspraxis ist es bequem, noch eine Mikro-Nierenerepsineinheit (N.-er.-e.) = 0,001 N.-Er.-E. einzuführen.

Beispiel 1: 2,5 ccm Enzymlösung III im üblichen Ansatz (12,5 ccm Leucylglycin, 25 ccm Gesamtvolumen, Titrationsproben von 10 ccm, Titration mit n/5-Lauge); Aciditätszuwachs pro Titrationsprobe (= 1 ccm Enzymlösung) in 135 Min. = 0,69 ccm n/5-Säure. Also 1 ccm Enzymlösung III = 0,00048 N.-Er.-E.= 0,48 N.-er.-e.

Beispiel 2: 1,25 ccm Enzymlösung III im halben Ansatz (6,25 ccm Leicylglycinlösung, 12,5 ccm Gesamtvolumen, Titrationsproben von 5 ccm, Titration mit n/10-Lauge); Aciditätszuwachs pro Titrationsprobe (= 0,5 ccm Enzymlösung) in 135 Min. 0,69 ccm n/10-Lauge. Also 0,5 ccm Enzymlösung III = 0,00024 N.-Er.-E. = 0,24 N.-er.-e.

Tabelle 13 gibt einen Überblick über den Histozym- und Erepsingehalt von Enzymlösungen, die alle auf die gleiche Art, aber zu verschiedenen Zeiten aus den Organen verschiedener Tiere und von verschiedenem Alter, Rasse und vor allem Gesundheitsverhältnissen hergestellt waren. Im allgemeinen gaben dunkelrote Nieren von fester Struktur guten Histozym- und nicht sehr hohen Erepsingehalt, während blasse, aufgedunsene Organe sich meist durch sehr hohen Erepsin- und geringeren Histozymgehalt auszeichneten. Differiert das Wirkungsverhältnis verschiedener Enzymlösungen gegenüber ähnlichen Substraten - Hippursäure und das Peptid Leucylglycin -, wie es sich aus der Tabelle ergibt, so

darf allerdings streng genommen daraus allein noch nicht auf verschiedene Enzymindividuen geschlossen werden, da Begleitstoffe Schuld tragen können an Änderung der Affinität eines Enzyms zu verschiedenen Substraten[1]. Daß der Vergleich der für die Spaltung verschiedener Substrate optimalen Wasserstoffzahlen nicht zur Identifikation von Enzymen herangezogen werden kann, wurde schon früher[2] erörtert. Dasselbe gilt auch für den Vergleich des Reaktionsverlaufes[3]. Allein ausschlaggebend ist die Trennung der Enzymwirkungen.

Tabelle 10.

p_H-Abhängigkeit des Nierenerepsins.

12,5 ccm Leucylglycinlösung = 0,4705 g d,l-Leucyglycin; 12,5 ccm m/5 Phosphatpuffer (Nr.1 bis 5) bezw. 2 ccm Ammoniak-Ammonchloridpuffer (Nr. 6 u. 7); 2 ccm Enzymlösung V; wechselnde Mengen Alkali oder Säure zur Einstellung des p_H; Wasser bis zum Gesamtvolumen von 25 ccm. 5 Stdn. 30°. Titrationsproben von 10 ccm; Spaltung in n/5 KOH.

Nr.	p_H	Spaltung	Pufferart
1	6,8	0,65	m/5 Phosphatgemisch
2	7,1	1,00	
3	7,6	1,47	
4	7,8	1,70	
5	8,0	1,60	
6	7,5	1,45	2,5 n-NH_3-NH_4Cl-Gemisch
7	7,8	1,66	

1) R.KUHN, H. 125, 1 ff.; R.WILLSTÄTTER u. Fr.MEMMEN H.133, 244/46 (1924)

3) R.WILLSTÄTTER u. E.BAMANN, H.151, 245-252 (1925)

2) II A 3 dieser Arbeit. K.JOSEPHSON, H.147, 20-26(1925)

Tabelle 11.

Reaktionsverlauf der Spaltung von d,l-Leucylglycin durch Nierenerepsin.

50 ccm Leucylglycinlösung; 10 ccm Puffer (Ammoniak: Ammonchlorid = 1:16 ; 2,5 n.); 20 ccm Nierenextrakt V; Wasser ad 100 ccm. 30°. Titrationsproben von 10 ccm.

Dauer Min.	Spaltung ccm n/5 KOH	%	$k_1 = \frac{1}{t} \lg \frac{a}{a-x}$	$k_2 = \frac{1}{t} \lg \frac{2a}{2a-x}$
60	0,62	12,4	0,0021	0,00096
120	1,20	24	0,0024	0,00099
240	2,01	40,2	0,0030	0,00093
362	2,37	47,4	0,00036	0,00077
480	2,40	48	-	-
2880	2,49	49,8	-	-

Tabelle 12.

Enzymmenge und Reaktionsgeschwindigkeit.

25 ccm Leucylglycinlösung; 5 ccm Puffer; Enzymmengen (Extrakt Nr. V) nach Angabe; Glycerin incl.Enzymlösung bis zu einem Gesamtgehalt von 20%; Wasser ad 50 ccm. 30°. Titrationsproben von 10 ccm.

Enzymmenge ccm	Dauer Min.	Spaltung ccm n/5 KOH	k_1	k_2
10	60	0,50	0,0016	0,00076
"	120	0,95	0,0017	0,00076
"	240	1,65	0,0020	0,00073
5	120	0,50	0,00081	0,00038
"	240	0,98	0,00090	0,00039
"	480	1,68	0,00101	0,00037
2,5	240	0,50	0,00040	0,00019
"	480	0,95	0,00043	0,00019
"	960	1,66	0,00049	0,00018

Tabelle 13.

Verhältnis des Histozym - und Erepsingehaltes in verschiedenen Nierenextrakten.

Die Zahlen beziehen sich auf 3 ccm Extrakt.

Extrakt Nr.	H.-E.	N.-er.-e.	H.-E.:N.-er.-e.
III	0,36	1,41	1 : 3,9
VII	1,10	5,10	1 : 4,6
VIII	0,45	5,25	1 : 11,7
IX	1,15	16,5	1 : 14,4
X	0,72	8,50	1 : 11,8
XI	1,35	8,10	1 : 6

C. Nierenesterase.

Nachweis.

A.J.LAMBERT[1] zeigte die Verseifung von Estern der Salicylsäure, M.LOEPER und D.FICAI[2] von Monobutyrin durch Nierenferment; in dieser Arbeit geschieht der Nachweis der Nierenesterase in Anlehnung an das Verfahren von R.WILLSTÄTTER und F.MEMMEN[3] zur Bestimmung der Pankreasesterase mit Methylbutyrat als Substrat und bei $p_H = 8,6$. Der Enzymgehalt der rohen Nierenextrakte ist sehr groß; die ungereinigte Nierenesterase wird in ihrer Wirkung nicht beeinflußt durch Zusatz von Kalksalzen, Seife oder Albumin (Versuch 1 bis 3). Die Prüfung auf Esterase in gereinigten Enzymlösungen[4] muß bei Gegenwart dieser Aktivatoren erfolgen, da bei den Reinigungsoperationen natürliche Aktivatoren entfernt werden können und so die Abwesenheit von Esterase vorgetäuscht werden kann.

Versuche: 1. 0,5 ccm Methylbutyrat; 15 ccm Glycerin; 10 ccm Puffer (Ammoniak:Ammonchlorid = 1:2 ; 2,5 n.); 5 ccm Enzymlösung X ; Wasser ad 50 ccm.

2. Ansatz wie bei 1., aber unter Zusatz von 1 ccm 2 %iger Natriumoleatlösung und 1/2 ccm 4 %iger Calciumchloridlösung.

3. Ansatz wie bei 2., aber mit Zusatz von 3 ccm 10 %iger Albuminlösung.

Zu Beginn und am Ende der Bestimmungszeit werden Proben des Verseifungsgemisches à 10 ccm eingetragen in 20 ccm n/10 HCl und nach Zusatz von 12 Tropfen 0,5 %iger alkoholischer Lösung von Bromkresolpurpur mit n/10 Lauge titriert.

Spaltung in 2 Stunden (nach Abzug des Betrages, der auf die Substratspaltung durch p_H-Wirkung trifft): 1. 3,32 ; 2. 3,30 ; 3. 3,35 ccm n/10 S.

---

1) Thèse Lille 1903. Nach Maly's Jahresber.1903 S.1068.

2) Soc.Biol. 62, 1018

3) H. 133, 231 ff. (1924).

4) Teil III B 17 dieser Arbeit.

III.

ADSORPTIONSVERHALTEN DES HISTOZYMS UND SEINE TRENNUNG VON NIERENEREPSIN UND -ESTERASE.

A. Allgemeiner Teil.

Histozym ebenso wie Erepsin werden allein für sich betrachtet von Kaolin, Tonerde, Eisenhydroxyd aus saurer Lösung (p_H = 4,7) stärker adsorbiert als aus neutraler (p_H = 7,0) - siehe Tabelle 15 bis 17. Aus einem Gemisch der beiden Enzyme wird nach Tabelle 14 unter vergleichbaren Bedingungen aus s a u r e r L ö s u n g vorwiegend E r e p s i n aufgenommen und der Unterschied wird umso ausgeprägter, wenn wir von Kaolin zur Tonerde, von dieser zum Eisenhydroxyd übergehen - er nimmt also mit der B a s i c i t ä t d e s A d s o r b e n s zu. Umgekehrt bei Adsorption aus n e u t r a l e r L ö s u n g : nun geht das H i s t o z y m vor dem Erepsin ins Adsorbat und der Unterschied ist umso größer, je s a u r e r d a s A d s o r b e n s (Kaolin saurer als Tonerde).

Tabelle 14.

Basicität des Adsorbens und Adsorption von Histozym und Erepsin

Adsorbens	p_H	Adsorbiertes Erepsin %	Adsorbiertes Histozym %	Enzymlösung Nr.	Histozym:Erepsin	vgl.exp. Teil	Zunahme d.Basicität d.Adsorbens
Kaolin	4,7	96	58	VII a	1 : 4,6	Tb,16 Nr.11	
Tonerde	"	94	13	"		Tb.15 Nr. 5	↓
Tonerde	"	90	75	X	1 : 12	Tb.15 Nr.6a	
Eisenhydr.	"	92	14	"		Tb.17 Nr. 3	↓
Kaolin	7,0	-	59	VII a	1 : 4,6	Tb.16 Nr.13/14	
Tonerde	"	17	55	III	1 : 4	Tb.15 Nr. 9	↓
Tonerde	"	50	83	"		Tb.15 Nr. 8	

Die Rolle des Adsorbens ist offenbar eher eine chemische[1] als eine kolloidchemische. Der Einfluß der Acidität auf die Adsorption wird so zu deuten sein, daß manche Adsorbentien in der bei amphoteren Stoffen bekannten Art reagieren: im sauren Medium zeigen sie basische Eigenschaften, im alkalischeren Medium mehr saure; dies trifft in vorliegendem Falle nicht nur auf das ja als amphoter bekannte Aluminiumhydroxyd, sondern - eben wegen seines Tonerdegehaltes - auch auf das Kaolin zu. Dem Histozym, das von den sauren Adsorbentien vorgezogen wird, werden wir basischere Eigenschaften zuschreiben als dem Erepsin, das wiederum von beiden Enzymen die größere Affinität zu basischen Adsorbentien besitzt. Diese Anschauung wird gestützt durch gewisse weiter unten zu berichtende Erfahrungen bei der Elution sowie über die reversible Inaktivierung des Histozyms durch Kaolin. Interessant ist ein Vergleich mit dem Pankreastrypsin. Dieses besitzt nach einer Untersuchung von R.WILLSTÄTTER und E.WALDSCHMIDT-LEITZ[2] und von E.WALDSCHMIDT-LEITZ und A.HARTENECK[3] eine ausgesprochene Verwandtschaft zu Kaolin; von Tonerde wird es bei p_H = 7,0 träger aufgenommen, gar nicht mehr bei p_H= 4,7 - also wenn die Tonerde basischer reagiert. Der große Basicitätsunterschied zwischen Pankreastrypsin und Pankreaserepsin, das dem Nierenerepsin nicht nur im p_H-Optimum und im Reaktionsver-

---

1) vgl. dazu L.MICHAELIS u. M.EHRENREICH, Bio 7, 488 ; 10, 283 ; 12, 26 (1908). H.ISCOWESCO, Bio. 24,53 (1919). R.WILLSTÄTTER u. E.WALDSCHMIDT-LEITZ, H. 125, 139, 142 (1922/23) E.WALDSCHMIDT-LEITZ, A.SCHÄFFNER u. W.GRASSMANN, H. 156, 83 (1926). u.a.

2) l.c. 3) H 147, 239.

lauf, sondern auch im Adsorptionsverhalten gleicht, ermöglicht die Trennung der beiden Enzyme durch die einfachsten Adsorptionsvornahmen; Histozym steht hinsichtlich der Basicität zwischen Trypsin und Erepsin, ganz nahe bei letzterem und dieser geringe Unterschied läßt voraussehen, daß für eine Scheidung die gewöhnliche Adsorptionstechnik allein nicht ausreichen werde.

In der Tat sehen wir (Tabelle 17), wenn durch ein stärker basisches Adsorbens wie Eisenhydroxyd, das noch die günstigsten Resultate liefert, ungefähr 90 % Erepsin weggeschafft sind, gehen von da an steigende Mengen Histozym ins Adsorbat, Erepsin wird langsamer adsorbiert und hält sich hartnäckig in den Mutterlaugen. Dies Ergebnis ändert sich auch nicht wesentlich, wenn man das Adsorbens wechselt, wenn man nach Voradsorption mit Eisenhydroxyd weiterarbeitet mit Tonerde (III B 4). Nach Tabelle 16 sollte die Anwendung geringerer Mengen des sauren Adsorbens Kaolin in neutraler Lösung auf Grund der Untersuchung der Restlösung ziemlich reines Histozym im Adsorbat ergeben; die zuverlässigere Analyse/der Elution/ (III B 5 b) macht auch diese Hoffnung zu Schanden und der Erfolg wird nicht größer, wenn man vor der Kaolinadsorption die Hauptmenge des Erepsins mit Tonerde in saurer Lösung wegschafft (III B 5 c).

Begleitstoffe sind oft von entscheidender Bedeutung für das Adsorptionsverhalten der Enzyme. Manchmal ist es gelungen durch Verdünnung die störenden Enzym-Begleitstoff-Komplexe zur Dissoziation[1] zu bringen

1) R. WILLSTÄTTER u. W. WASSERMANN, H. 123, 181 (1922).

oder durch wechselnden Gehalt von Alkohol, Aceton, Glycerin die Ladung solcher Komplexe, wenn sie amphotere Stoffe[1] enthalten, in einem gewünschten Sinne zu verändern. Im experimentellen Teil (III B 3) wird gezeigt, daß sowohl Verdünnung als auch Änderung des Glyceringehaltes in dem angeführten Fall (Glycerinextrakt IX) nur ganz geringfügigen Einfluß ausüben, und zwar wird bei Adsorption mit Kaolin in neutraler Lösung durch hohe Enzymkonzentration (geringe Verdünnung) und hohen Glyceringehalt die Adsorption des Histozyms begünstigt; bei Adsorption mit Tonerde bei p_H = 4,7 setzt hoher Glyceringehalt die Adsorption der beiden Enzyme herab, hohe Enzymkonzentration vermindert die Adsorption des Histozyms, vermehrt die des Erepsins. In einem anderen Fall (Glycerinextrakt X) war überhaupt keine Beeinflussung der Adsorption durch die genannten Operationen zu bemerken.

Die spezifische Adsorption eines Enzyms muß sich durchführen lassen durch Bindung desselben an ein schwerlösliches Substrat oder an solche schwerlösliche Spaltprodukte von Substraten, die unter geeigneten Bedingungen eine Affinität nur zu dem betreffenden Enzym entwickeln. Die erste von diesen beiden Methoden haben schon M.BLEIBTREU und E.ATZLER[2] zur Isolierung des Ferments der Blutgerinnung und L.AMBARD[3] mit der Bindung von Amylase an Stärke befolgt. In neu-

---

1) vgl. W.LÖFFLER u.K.SPIRO, Helv.chim.acta 2, 540 (1919); R.WILLSTÄTTER u.E.WALDSCHMIDT-LEITZ, B. 54, 2991 (1921).
2) Pflügers Archiv 181, 340(1920); 194, 318 (1922).
3) Soc.Biol. 83, 1458; 84, 230 (1921). H. 125, 143 (1923).

ester Zeit haben E.WALDSCHMIDT-LEITZ und K.LINDERSTRÖM-LANG[1] auf diese Weise eine sichere Trennung von Trypsin-Kinase und inaktivem Trypsin durchgeführt. Allerdings kann man es erleben, daß ein Stoff auch solche Enzyme bindet, von denen er nicht gespalten wird. Während es in der zuletzt zitierten Arbeit gelang, Trypsin-Kinase durch Bindung an ihr Substrat Casein von dem nahestehenden Trypsin zu trennen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Erfahrung gemacht, daß von Casein auch die der Trypsin-Kinase entfernter stehenden Enzyme Erepsin und Histozym glatt adsorbiert werden (III B 10). Wenn weiter bei der Behandlung der Nierenextrakte mit Hippursäure (III B 9), dem spezifischen Substrat des Histozyms, außer diesem auch Erepsin vollkommen adsorbiert wird, so wird, nach der Färbung des Adsorbates und der Entfärbung der Restlösung zu schließen, Hippursäure wie viele andere organische Säuren auch, zunächst als Fällungsmittel auf gewisse Eiweißstoffe der Enzymlösung wirken, die dann ihrerseits wieder das Erepsin mit sich reißen. Die Anwendung der zweiten oben erörterten Möglichkeit, Bindung des Enzyms an ein schwerlösliches Spaltprodukt eines seiner Substrate, war bis zu einem gewissen Grade von Erfolg begleitet. Es gelang mit Tyrosin nach dem in Teil III B 6 beschriebenen Verfahren bis zu 90% des Erepsins zu entfernen, während der Verlust an Histozym sich auf die übliche mechanische Einbuße bei der präparativen Arbeit beschränkte. Den Erepsingehalt noch weiter zu drükken gelang nicht, auch durch mehrmalige Wiederholung der

---

1) H. 166, 241 (1927).

Fällungen und Anwendung höherer Tyrosinkonzentrationen - sei es, daß die Dissoziation der Erepsin-Tyrosinverbindung zu groß ist, als daß bei geringerem Gehalt noch wesentliche Fermentmengen gebunden werden, sei es, daß eine Affinität des Erepsins zum Tyrosin nur bei dem alkalischen p_H der Tyrosinlösung besteht und dass bei der Ausfällung des Tyrosins mit Essigsäure selbst unter den angewandten Vorsichtsmaßregeln immer wieder ein Teil der Tyrosin-Erepsinverbindung zerfällt. Nach Voradsorption von 90% des Erepsins mit Tyrosin, brachte auch der weitere Einsatz von Eisenhydroxyd (III B 8) oder von Tonerde (III B 7) dem Ziele: Darstellung enzymatisch einheitlichen Histozyms nicht näher. Histozymfreies Erepsin wurde in letzterem Falle allerdings erhalten.

Es muß noch bemerkt werden, daß die spezifischen Adsorptionen durch Ausfällung der Adsorbentien in der Enzymlösung selbst vorgenommen wurden. Dies Verfahren ist wirksamer als die Behandlung mit ungelöstem Adsorbens, worauf schon R.WILLSTÄTTER, K.SCHNEIDER u.E.WENZEL[1] aufmerksam gemacht haben.

Die E l u t i o n der aus neutraler Lösung hergestellten Kaolinadsorbate mit Ammoniak liefert meist fast 100%ige Ausbeute des adsorbierten Histozyms als auch Erepsins (III B 12 a). Die Ausbeute ist etwas geringer, wenn die Kaolinmenge und also auch die Menge des adsorbierten Enzyms klein ist gemessen an dem Enzymgehalt der Ausgangslösung. Bei der Elution von Tonerde-

---

1) H.151, 4 (1925/26).

und Eisenhydroxydadsorbaten mit irgend welchen Eluentien bleibt die Ausbeute immer ziemlich hinter der zu erwartenden zurück. Behandelt man ein Tonerdeadsorbat mit sekundärem Natriumphosphat, so sinkt das p_H der Phosphatlösung - der Elutionsvorgang wird also zum größten Teil auf Alkaliwirkung zurückzuführen sein - und in der vom Adsorbens abgetrennten Flüssigkeit sind Histozym und Erepsin in ungefähr dem gleichen Mengenverhältnis wie im Adsorbat (III B 11 a). Das letztere gilt auch von einem Phosphatgemisch vom $p_H = 7,0$; entsprechend seinem geringeren Alkaligehalt gibt es aber schlechtere Ausbeuten (III B 11 b). Primäre Phosphatlösung, die den geringsten Alkaligehalt von allen Phosphatpuffern hat, liefert, wenn auch in schlechter Ausbeute, histozymfreies Erepsin (III B 11 c). In den mit n/40 Ammoniak nach III B 12 b aus Tonerdeadsorbaten erhaltenen Lösungen ist das Mengenverhältnis der Enzyme gegenüber dem Adsorbate zugunsten des Erepsins verschoben. Eluiert man mit Ammoniak fraktioniert, so erhält man in der ersten Elution histozymfreies Erepsin, wenn auch in schlechter Ausbeute, in der folgenden Elution aber ist das Mengenverhältnis der Enzyme gegenüber dem Adsorbat verschoben zugunsten des Histozyms (III B 12 c).Das gleiche Ergebnis wird bei Eisenadsorbaten erhalten (III B 12 d). Es zeigt sich also hier bei der Elution, ebenso wie es oben bei der Adsorption beschrieben wurde, ein Unterschied der beiden Enzyme und zwar vom chemischen Gesichtspunkte der Basicität aus, indem das früher als weniger basisch, also als sauer bezeichnete Erepsin bei der Anwendung

genügend kleiner Alkalimengen (Primärphosphat; wenig Ammoniak) bevorzugt eluiert wird. Praktisch kann man durch die fraktionierte Elution mit Ammoniak, durch Vorelution des Erepsins, eine relative Anreicherung an Histozym erreichen (III B 12 c : Histozym:Erepsin im Adsorbat = 1:13; in der zweiten NH_3-Fraktion = 1:6). Ist durch andere Methoden der Gehalt des Erepsins sehr weitgehend erniedrigt worden, so lassen sich die letzten Reste durch fraktionierte Ammoniakelution entfernen und so erepsinfreies Histozym gewinnen (III B 17).

Es liegt nahe auch bei der Elution spezifisch enzymatische Affinitäten zur Trennung von Enzymgemischen, die als Adsorbate vorliegen, zu benützen. Allgemein gilt für die spezifische Elution entsprechend das Gleiche wie für die spezifische Adsorption (Seite 42/43).

Behandelt man Kaolinadsorbate (aus neutraler Lösung erhalten) mit Hippuratlösung vom $p_H = 7,1$ (III B 13 a), so erhält man eine Lösung mit nur ganz geringem Histozymgehalt; da bei dem Vorgang das p_H etwas in das saure Gebiet rückte, so dürfte der geringe Enzymgehalt eher auf eine Elution durch das im Hippurat enthaltene Alkali als auf eine spezifische Wirkung des Hippurates auf das Enzym selbst zurückzuführen sein. Damit stimmt auch die Beobachtung überein, daß Kaolin die Spaltung des Hippurats durch Histozym stark hemmt (III B 16b). Letzteres scheint im Kaolinadsorbat einer reversiblen Inaktivierung zu unterliegen, denn man kann es ja davon, mit (III B 12 a) oder ohne (III B 5 a) Vorbehandlung mit Hippurat, durch Ammoniak fast vollstän-

dig wieder ablösen.

Bei der Einwirkung von Hippurat auf Eisenhydroxydadsorbate scheint neben einer Zerstörung der Adsorptionsschicht durch Salzbildung - hippursaures Eisen ist schwerlöslich - noch eine spezifische Wirkung des Hippurats auf das Histozym vorzuliegen; denn einerseits ist der Erepsingehalt der Elution nicht unbeträchtlich, andererseits ist das Mengenverhältnis der Enzyme in der Elution gegenüber dem Adsorbat zugunsten des Histozyms verschoben (III B 13 b).

Besonders wirksam scheint die spezifische Affinität der Hippursäure gegenüber dem Histozym zu sein, wenn dieses an denaturiertes Protein gebunden ist. Erhitzt man einen Nierenextrakt bei ungefähr 80 % Glyceringehalt auf 70° und läßt dann in Wasser einfließen, so kann man das ganze Histozym in dem abgetrennten Proteinniederschlag nachweisen; ersetzt man das Wasser durch neutrale Natriumhippuratlösung, so bleibt das ganze Histozym in Lösung, das Erepsin geht bis auf einen geringen Rest ins Protein (III B 13 c bezw. 16a).

Die spezifische Elution des Erepsins aus Adsorbaten mit Leucylglycinlösung (III B 14) ist nur dann vollständig und für eine Darstellung enzymatisch reinen Histozyms brauchbar, wenn vorher durch andere Methoden der Erepsingehalt weitgehendst herabgesetzt worden war, wie es auch früher schon bei der fraktionierten Ammoniakelution (S.46 oben) beschrieben wurde - eine Erfahrung, die auch E.WALDSCHMIDT-LEITZ, A.SCHÄFFNER und W.GRASSMANN[1] machen mußten bei dem Versuche, Trypsin

1) H. 156, 85/86 (1926): vgl. Versuch 3 und 4.

im Adsorbat durch Behandlung mit Caseinlösung von Trypsin-Kinase zu befreien.

K.JOSEPHSON und H.v.EULER[1] beschrieben die Inaktivierung von Verdauungserepsin durch Aldehydreagentien. Da Nierenerepsin in den bisher untersuchten Eigenschaften nicht von diesem verschieden zu sein scheint, dürfte es wohl auch die genannten Inaktivierungserscheinungen zeigen. Für unsere praktischen Zwecke ohne Belang, da auch Histozym (II A 4) durch Blausäure, Sulfit und Amine gehemmt bezw. inaktiviert wird.

In verdünnten Glycerinextrakten (Glyceringehalt ca. 35 - 40 %) werden beide Enzyme beim Erhitzen auf 70° weitgehend und ziemlich gleichmäßig zerstört.- mit nur geringen Unterschieden, so zwar daß Erepsin bei $p_H = 8,4$, Histozym bei $p_H = 7,1$, also beide in der Nähe ihrer optimalen Wasserstoffionenkonzentration, etwas beständiger ist (III B 15 a). Bei einem Glyceringehalt von ca. 75 - 80 % und einer Temperatur von 70°, ohne Pufferzusatz, zeigt Histozym die größere Stabilität, seine Wirksamkeit sinkt in 8 Stunden bis auf 68 % der anfänglichen, die des Erepsins auf 12 %. Erst bei 85° tritt vollständige Inaktivierung beider Enzyme ein (III B 15b).

Durch Kombination verschiedener besprochener Methoden ergibt sich dann der im experimentellen Teil (III B 17) durchgeführte Arbeitsgang zur Darstellung enzymatisch einheitlichen Histozyms: die Enzymlösung mit einem Glyceringehalt von ca. 75 - 80 % wird 4 bis 8 Stunden auf 70° erhitzt, dann in Natriumhippuratlösung vom

---

1) l.c.

p_H = 7,1 eingegossen und von dem ausgefällten denaturierten Eiweiß abzentrifugiert. Aus der so erhaltenen Lösung werden die Enzyme bei p_H = 4,7 mit Eisenhydroxyd aufgenommen und das Adsorbat mit wenig Ammoniak, zuverlässiger mit Leucylglycinlösung von den letzten Erepsinresten befreit. In der dann aus dem Adsorbat mit Ammoniak hergestellten, neutralisierten Lösung ist Histozym nicht lange haltbar; es empfiehlt sich daher das Adsorbat selbst, dessen Histozymwirkung sehr beständig ist, zu verwenden. Die Prüfung ergibt Freiheit von Erepsin und Esterase.

B. Experimenteller Teil.

1. Adsorption des Histozyms mit Tonerde, Kaolin und Eisenhydroxyd im Vergleich zu der des Erepsins.

Zu Tabelle 15 und 16.

Die Enzymlösungen wurden mit n/10 HCl und Natriumacetat-Essigsäuregemisch auf p_H = 4,7 - bezw. mit n/10 KOH auf p_H = 7,0 eingestellt, mit Wasser aufgefüllt und mit den angegebenen Adsorbensmengen adsorbiert; das Gesamtvolumen betrug das dreifache der angewandten Enzymlösung; Glyceringehalt also ca. 30%.

Für die Versuche 1 bis 3, 7 bis 9, 10, 11 und 15 fand Enzymlösung III Verwendung (Erepsingehalt: 1 ccm in 135 Min. 0,69 ccm n/5 Säure Spaltung = 0,48 N.-er.-e. ; Histozym: 4 ccm in 48 Stdn. 1,54 ccm n/5 Säure = 0,4 H.-E.; H.-E.: N.-er.-e. = 1:3,9).

Für Versuch 4 bis 6 und 12 bis 14 Enzymlösung VII a (1 ccm in 296 Min. 1,80 ccm n/5 Säure = 0,66 N.-er.-e.; 4 ccm in 48 Stdn. 2,02 ccm n/5-Säure = 0,53 H.-E.; H.-E.:N.-er.-e. = 1 : 4,6).

Für Versuch 6 a Enzymlösung X (Erepsin: 0,5 ccm in 49 Min. 1,37 ccm n/10 Säure +) = 1,42 N.-er.-e.; Histozym: 1,5 ccm in 24 Stdn. 1,45 ccm n/10 Säure +) = 0,36 H.-E.; H.-E.: N.-er.-e. = 1:11,8).

Die Menge des Adsorbens gilt für 4 N.-er.-e.

Die angegebenen Spaltungen verstehen sich bei Erepsin für 3 ccm Adsorptionsrestlösung entspr. 1 ccm ursprünglicher Enzymlösung, bei Histozym für 12 ccm Restlösung entspr. 4 ccm Enzymlösung.

Tabelle 15

Adsorbens: Tonerde.

Adsorbens ccm	p_H	Mutterlauge: Zeit Min.	ccm n/5 S.	Erepsin N.-er.-e.	ads. Er. %	Restlsg.: Zeit Stdn.	Histozym ccm n/5 S.	H.-E.	ads. Hist.-%
4	4,7	130	-	-	100	96	0,04	0,006	99
1	"	239	-	-	100	"	0,23	0,032	92
0,3	"	239	0,12	0,044	92	"	1,54	0,22	46
0,3	"	120	0,12	0,09	83	48	1,55	0,40	25
0,2 + 0,1	"	120	0,05	0,04	94	"	1,68	0,46	13
0,2+0,2+0,1	"	259	0,15	0,05	92	24	0,50	0,24	59
+) 0,3	"	346	1,0+)	0,14	90	"	1,12+)	0,27	75
4	7,0	132	0,03	0,02	96	96	0,05	0,008	98
1	"	235	0,60	0,24	50	"	0,48	0,068	83
0,3	"	237	1,09	0,447	17	"	1,26	0,18	55

+) Versuch 6 a: Enzymlösung X; Titrationswerte in n/10 Sre.; über die Enzymbestimmung siehe Tab. 17.

Tabelle 16.

Adsorbens: Kaolin.+)

r.	Adsorbens ccm	p_H	Mutterlauge: Zeit Min.	ccm n/5 S.	Erepsin N.-er.-e.	ads. Er. %	Restlsg.: Zeit Stdn.	ccm n/5 S.	Histozym H.-E.	ads. Hist. %
)	4	4,7	229	-	-	100	96	0,48	0,068	83
	1	4,7	224	0,05	0,02	96	"	1,19	0,17	58
	6	7,0	316	0,52	0,15	77	48	-	-	100
	4	"	315	1,95	0,68	-	"	0,84	0,22	59
	2+2	7,0	314	1,95	0,68	-	"	0,87	0,22	59
	2	"	133	0,75	0,53	-	96	2,03	0,29	27

+) Chinesisches Kaolin, mit HCl ausgekocht, neutral gewaschen.

Tabelle 17.

Adsorbens: Eisenhydroxyd.

Für diese Versuche fand Enzymlösung X Verwendung (Erepsin: 0,5 ccm = 1,42 N.-er.-e. -Histozym: 1,5 ccm = 0,36 H.-E.)

Ausführung der Adsorption nach den Angaben von Tabelle 15. Die Menge des Adsorbens gilt für 34 N.-er.-e. und 2,88 H.-E. = 12 ccm Enzymlösung X.

Die Spaltungswerte beziehen sich bei Erepsin auf 1,5 ccm Adsorptionsrestlösung entspr. 0,5 ccm ursprüngliche Enzymlösung in 5 ccm-Proben gemessen mit n/10 Lauge; bei Histozym für 4,5 ccm Adsorptionsrestlösung = 1,5 ccm Enzymlösung, bestimmt nach Ausführung 2.

.	Adsorbens ccm	p_H	Mutterlauge: Zeit Min.	ccm n/5 S.	Erepsin N.er.-e.	ads. Er. %	Restlsg.: Zeit Stdn.	ccm n/5 S.	Histozym H.-E.	ads. Hist. %
	2,4	4,7	61	0,12	0,085	94	24	0,45	0,11	70
	0,4	"	60	0,04	0,03	98	-	-	-	-
	0,2+0,1+0,1	"	1570	2,1	0,12	92	24	1,28	0,31	14
	0,2+0,2+0,1	"	870	0,45	0,0235	98	"	0,75	0,18	50
	2,4	7,0	58	1,65	1,50	-	"	1,40	0,35	3
	0,4	""	57	1,53	1,39	-	"	1,42	0,35	3
	0,2+0,2+0,1	3,8	1440	2,20	0,09	94	48	0,62	0,08	78

2. Adsorption der Nierenesterase durch Eisenhydroxyd, Tonerde und Kaolin im Vergleich zu Histozym.

8 ccm Enzymlösung X werden im Gesamtvolumen von 24 ccm adsorbiert: 1. mit 0,60 ccm Eisenhydroxyd bei $p_H = 4,7$ – 2. mit 1 ccm Tonerde bei $p_H = 4,7$ 3. mit 6 ccm Kaolin bei $p_H = 7,0$.

15 ccm Adsorptionsrestlösung entspr. 5 ccm Enzymlösung X (in 2 Stdn. 4,30 ccm n/10 Säure Spaltung) geben in 2 Stdn. einen Aciditätszuwachs von
1. 3,03 ; 2. 2,00 ; 3. 3,80 ccm n/10 Säure.

Die Adsorption der Esterase beträgt also ungefähr:
1. 29% 2. 53 % 3. 11 %.

Die entsprechenden Histozymwerte, geschätzt nach Tabelle 15 bis 16, sind ungefähr:
1. 30 % 2. 15 % 3. 30 bis 40 %.

3. Adsorption bei verschiedener Enzym- und Glycerinkonzentration.

a) Adsorption mit Kaolin bei $p_H = 7,0$.

Je 15 ccm Enzymlösung IX (Histozym: 3 ccm in 24 Stdn. 2,25 ccm n/5 Säure = 1,15 H.-E.) werden mit n/10 KOH auf $p_H = 7,0$ gebracht; bei Versuch 4 werden noch 30 ccm Glycerin zugesetzt; es wird mit Wasser aufgefüllt soweit, daß unter Einfluß des später zuzusetzenden Adsorbens folgendes Gesamtvolumen erreicht wird: bei Nr.1) 30, 2) 45 3) und 4) 90 ccm. Dann wird mit 12 ccm Kaolinsuspension adsorbiert und in entsprechenden Teilen der Adsorptionsrestlösung Histozym bestimmt.

Tabelle 18.

Spaltung in 24 Stdn., gemessen mit n/5 Lauge.

Vers. Nr.	Verdünnung der Enzymlösg.	Glycerin-Konzentration %	Histozym in Restlsg. ccm Restlsg.	ccm Spaltung	H.-E.	adsorb. Histozym %
1	1 : 2	50	6	1,90	0,95	17,4
2	1 : 3	30	9	2,16	1,10	4,4
3	1 : 6	16,5	18	2,28	1,16	–
4	1 : 6	50	18	2,12	1,07	7

b) Adsorption mit Tonerde bei $p_H = 4,7$

Je 6 ccm Enzymlösung X (Erepsin: 0,16 ccm= 0,43 N.-er.-e.; Histozym: 3 ccm = 0,80 H.-E.) werden mit n/10 HCl und Acetatpuffer auf $p_H = 4,7$ eingestellt; Zusatz von Glycerin: 1) und 2) 10 ccm, 3) 42 ccm. Gesamtvolumen incl. Adsorptionsmittel 1) 32 ccm 2) und 3) 96 ccm.

In der Adsorptionsrestlösung Bestimmung von Erepsin und Histozym. Bei der Histozymbestimmung konnten nicht vergleichbare Mengen der Adsorptionsrestlösung gemessen werden. Die gefundenen H.-E.-Werte sind in der Spalte "H.-E. korr." auf vergleichbare Teile umgerechnet.

Tabelle 19.

Vers. Nr.	Verdünnung der Enzymlösg.	Glycerin-Konzentration %	Erepsin in Restlsg. Zeit Min.	ccm Spaltung	N.-er.-e.	adsorb. Erepsin %
1	1 : 5,3	50	859	0,37	0,039	91
2	1 : 16	16,5	858	0,42	0,0445	89
3	1 : 16	50	856	0,50	0,0535	87

Vers. Nr.	Histozym in Restlösung ccm Restlsg.	Zeit Stdn.	ccm Spaltung	H.-E.	H.-E. korr.	adsorbiertes Histozym %
1	16	24	0,55	0,26	0,26	68
2	30	"	0,15	0,07	0,112	86
3	16	96	0,56	0,08	0,24	70

4. Adsorption mit Eisenhydroxyd, dann mit Tonerde.

24 ccm Enzymlösung X (68 N.-er.-e.; 5,8 H.-E.; siehe Tab. 17) werden bei $pH = 4,7$ im Gesamtvolumen von 72 ccm adsorbiert mit 0,4 + 0,4 + 0,2 ccm Eisenhydroxyd (siehe Tab. 17). Die Mutterlauge der Adsorption enthielt noch 1,13 N.-er.-e. und 2,88H.-E. (1,7% bezw. 50 % der Ausgangslösung). (Erepsin: 1,5 ccm in 870 Min. 0,45 ccm n/10 Säure = 0,0235 N.-er.-e.; Histozym: 4,5 ccm in 24 Stdn. 0,75 ccm n/10 Säure = 0,18 H.-E.)

36 ccm der Restlösung mit 0,565 N.-er.-e. und 1,44 H.-E. wurden dann mit 0,30 ccm Tonerde adsorbiert; Histozymgehalt der Restlösung unverändert (9 ccm in 24 Stdn., 1,75 ccm n/10 Säure); Erepsingehalt wenig vermindert: 0,518 N.-er.-e. (1,5 ccm in 880 Min. 0,40 ccm n/10 Säure.)

5. Voradsorption des Erepsins mit Tonerde, Adsorption des Histozyms mit Kaolin, Elution des Kaolinadsorbats mit Ammoniak

a) Vorversuch 1: Adsorption des Histozyms mit viel Kaolin, Elution mit Ammoniak.

16 ccm Enzymlösung VII a mit 2,16 H.-E. (8 ccm in 24 Stdn. 2,12 ccm n/5 Säure), mit n/10 KOH auf p_H = 7,0 eingestellt, wurden im Gesamtvolumen von 48 ccm mit 12 ccm Kaolin (5,6 ccm pro 1 H.-E.) adsorbiert. 24 ccm der Adsorptionsrestlösung entspr. 8 ccm Enzymlösung VII a enthielten noch 0,08 H.-E. (in 24 Stdn. 0,16 ccm n/5 Säure). Das Adsorbat wurde zweimal gewaschen mit 30 %igem Glycerin, dann eluiert mit 48 ccm Elutionsflüssigkeit (ein Teil Glycerin 87 %ige, 2 Teile n/40 Ammoniak). Elution neutralisiert mit Essigsäure. 24 ccm davon hatten die Wirkung von 0,98 H.-E. (in 24 Stdn. 1,96 ccm n/5 Säure). Ausbeute in der Elution = 98 % des adsorbierten Enzyms.

b) Vorversuch 2: Adsorption mit wenig Kaolin, Elution und Bestimmung von Histozym und Erepsin.

24 ccm Enzymlösung X = 64 N.-er.-e. und 6,4 H.-E. (0,16 ccm in 258 Min. 1,12 ccm n/5 Säure = 0,43 N.-er.-e. - 3 ccm in 24 Stdn. 1,63 ccm = 0,80 H.-E.), p_H = 7,0 ; Gesamtvolumen 48 ccm; Adsorbens: 16 ccm Kaolin (2,5 pro 1 H.-E.). Adsorbat dreimal gewaschen mit 30 %igem Glycerin, eluiert mit 48 ccm Elutionsflüssigkeit wie bei a); Elution neutralisiert mit Essigsäure; Ausbeute: 0,33 N.-er.-e. (3,2 ccm in 804 Min. 0,20 ccm - 0,022 N.-er.-e.) und 0,60 H.-E. (12 ccm in 24 Stdn. 0,35 ccm = 0,15 H.-E.).
H.-E.:N.-er.-e. in Enzymlösung X: 1:10; in Elution: 1:0,55 . Verschiebung: 1:18.

c) Hauptversuch:

Je 32 ccm Enzymlösung VII a mit je 21,12 N.-er.-e. und 4,3 H.-E. (siehe Tab. 15, Vorbem.) wurden bei p_H= 4,7 im Gesamtvolumen von 96 ccm adsorbiert:

a) 2 mal mit je 0,8 ccm Tonerde,
b) 3 mal mit je 0,8 ccm Tonerde

Die Restlösungen werden nach Neutralisieren adsorbiert und zwar

a) 3 mal mit je 8 ccm Kaolin (a_1, a_2, a_3).
b) 1 mal mit 24 ccm Kaolin.

Die Mutterlauge vom Kaolinadsorbat (128 ccm) enthielt bei a) noch 1,16 H.-E. (27 % von Enzymlösung VIIa) (32 ccm in 24 Stdn. 0,65 ccm n/5 Säure = 0,21 H.-E.) und 3,8 N.-er.e. (3 ccm in 24 Stdn. 1,30 ccm n/5 Säure = 0,09 N.-er.-e.). Die Adsorbate wurden je 3 mal gewaschen mit 30 %igem Glycerin, Adsorbat a_1, a_2, a_3 eluiert mit je 54 ccm, Adsorbat b mit 48 ccm Elutionsflüssigkeit wie unter a) und in den neutralisierten Elutionen Erepsin und Histozym bestimmt.

Tabelle 20.

Elution	ccm Rest-lösung	Erepsin Zeit Min.	in Restlösung ccm n/5 Säure	N.-er.e.+)	N.-er.-e.+) total
a_1	2	5340	0,1	0,0016	0,04
a_2	2	5400	0,5	0,0085	0,23
a_3	2	5760	1,2	0,02	0,54
b	2	2400	0,5	0,019	0,48

+) Die Angabe der Enzymmenge hat natürlich nur größenordnungsmäßige Bedeutung, da ihre Messung nicht in dem Bereich erfolgt, der bei der Aufstellung der Bestimmungsmethode untersucht wurde. Sie dürften im allgemeinen etwas zu hoch sein.

Elution	ccm Rest-lösung	Histozym Zeit Stdn.	in Restlösung ccm n/5 Säure	H.-E.	H.-E. total
a_1	16	24	0,15	0,07	0,24
a_2	16	"	0,15	0,07	0,24
a_3	16	"	0,24	0,12	0,41
b	24	48	0,78	0,20	0,40

6. Spezifische Adsorption des Erepsins mit Tyrosin.

0,1 m- und 0,4 m-Tyrosinlösungen werden hergestellt durch Lösen der Aminosäure in 2 Äquivalenten Natronlauge und Auffüllen zum entspr. Volumen.

Versuch 1: 16 ccm Enzymlösung IX mit 95 N.-er.-e. (0,8 ccm in 30 Min. 1,40 ccm n/5 Säure = 4,75 N.-er.-e.) und 6,15 H.-E. (3 ccm in 24 Stdn. 2,25 ccm n/5 Säure = 1,15 H.-E.) werden mit 20 ccm 0,1 m-Tyrosinlösung = 360 mg Tyrosin versetzt, dann mit Eis gekühlt, 3,2 ccm n/1 Essigsäure und Wasser (gekühlt) bis zu einem Gesamtvolumen von 64 ccm zugegeben, vom ausgefällten Tyrosin (braun gefärbt) abzentrifugiert und in der Restlösung Erepsin und Histozym bestimmt (siehe Tab.21).

Versuch 2: Eine Mischung von 4 ccm Glycerin, 5 ccm 0,1 m-Tyrosinlösung (= 90 mg Tyrosin) wird unter Eiskühlung mit 0,8 ccm n/1 Essigsäure und 2 ccm Wasser versetzt, abzentrifugiert. Werden 3,2 ccm dieser Restlösung dem Bestimmungsansatz zugefügt, so bewirken 0,8 ccm Enzymlösung IX in 31 Min. eine Spaltung von 1,45 ccm n/5 Säure = 4,8 N.-er.-e. Vgl. Versuch 1 ! also keine Hemmung des Erepsins durch in der Restlauge gelöstes Tyrosin.

Versuch 3: 8 ccm Enzymlösung IX mit 47,5 N.-er.-e. (0,8 ccm in 30 Min. 1,4 ccm n/5 Säure) und 2,48 H.-E. (3 ccm in 24 Stdn. 1,87 ccm n/5 Säure = 0,93 H.-E.) werden mit 4 ccm 0,1 m-Tyrosinlösung versetzt, mit Eis gekühlt, 0,6 ccm n/1 Essigsäure in 6,4 ccm Wasser zugesetzt, vom ausfallenden Tyrosin abzentrifugiert; bei der Restlösung wird die Behandlung noch zweimal mit je 3 ccm 0,1 m-Tyrosinlösung wiederholt. Gesamtvolumen am Ende: 32 ccm. Bestimmung von Erepsin und Histozym in der Restlösung siehe Tabelle 21.

Versuch 4: 8 ccm Enzymlösung IX werden im Gesamtvolumen von 33,5 ccm 5 mal mit je 3 ccm 0,1 m-Tyrosinlösung (=271,5 mg Tyrosin im ganzen) gefällt. Bestimmung von Erepsin in der Restlösung siehe Tabelle 21.

Versuch 5: 8 ccm Enzymlösung IX werden im Gesamtvolumen von 24 ccm mit 7,5 ccm 0,4 m- Tyrosinlösung (=543 mg Tyrosin) in 5 Portionen gefällt. Bestimmung von Erepsin in der Restlösung siehe Tabelle 21.

Tabelle 21.

Vers. Nr.	mg Tyrosin pro 8 ccm Enz.Lsg.IX	Ges.Vol. bei der Fällung	Zahl der Fällungen	Erepsin in Restlsg. ccm R.Lsg.	Zeit Min.	ccm n/5 S.	N.-er.-e.	ads. Er. %
1	181	32	1	3,2	228	1,95	0,94	81
3	181	32	3	3,2	124	0,70	0,53	89
4	270	33,5	5	1,6	910	1,75	0,205	89
5	543	24	5	3,6	156	2,08	1,495	80

Histozym in Restlösung: Versuch 1: 24 ccm in 24 St. 3,5 ccm n/5 Säure = 2,1 H.-E.; adsorbiertes Histozym: 9 %.

Versuch 3: 12 ccm in 24 Stdn. 1,75 ccm n/5 Säure = 0,87 H.-E. Adsorbiertes Histozym: 6,4 %.

7. Adsorption mit Tyrosin, dann mit Tonerde.

10 ccm Enzymlösung IX = 59,5 N.-er.-e. und 3,1 H.-E. (siehe III B 6, Versuch 3!) wurden im Gesamtvolumen von 40 ccm in der früher geschilderten Art mit 12,5 ccm m/10 Tyrosinlösung (226 mg Tyrosin) in 3 Portionen (5 + 3,75 + 3,75 ccm) behandelt. Die Restlösung enthielt noch 6,55 N.-er.-e. und 3,1 H.-E. (siehe Tabelle 21, Versuch 3) 30 ccm der Restlösung mit 4,9 N.-er.-e. und 2,2 H.-E. wurden mit 7,5 ccm n/1 Essigsäure auf p_H = 4,7 gebracht und dann mit 0,25+0,15 ccm Tonerde adsorbiert. In der Mutterlauge (37,5 ccm) von der Tonerdeadsorption fand sich kein Histozym mehr (12 ccm in 24 Stdn. keine Spaltung), dagegen noch 1,44 N.-er.-e. (3,2 ccm in 227 Min. 0,3 ccm in 227 Min. 0,3 ccm n/5 Säure = 0,12 N.-er.-e.).

Das Tonerdeadsorbat mußte also enthalten 3,46 N.-er.-e. und 2,2 H.-E.

H.-E.:N.-er.-e.		
	Ausgangslösung:	1 : 19
	nach Tyros.-Ads.	1 : 2,24
	im Tonerdeadsorbat:	1 : 1,57
	in Restlösung davon:	histozymfreies Erepsin.

8. Adsorption mit Tyrosin, dann mit Eisenhydroxyd.

8 ccm Enzymlösung IX = 47,5 N.-er.-e. und 2,48 H.-E. werden wie früher mit 10 ccm 0,1 m-Tyrosinlösung (=181 mg Tyrosin) in 3 Portionen (4 + 3 + 3 ccm) im Gesamtvolumen von 25,6 ccm behandelt; die Restlösung enthaltend 5,23 N.-er.-e. und 2,38 H.-E. wird mit 2,5 ccm n/1 Essigsäure auf p_H 4,7 gebracht und mit 0,3 + 0,2 ccm Eisenhydroxyd adsorbiert. In der Restlösung vom Eisenadsorbat fanden sich 2,5 N.-er.-e. (0,6 ccm in 845 Min. 0,90 ccm n/10 Säure = 0,05 N.-er.-e.) und 0,30 H.-E. (12 ccm in 24 Stdn.. 0,50 n/10 Säure = 0,12 H.-E.)

Im Eisenadsorbat müssen also enthalten sein: 2,73 N.-er.-e. und 2,02 H.-E.

H.-E.:N.-er.-e.		
	Enzymlösung IX	: 1 : 19
	nach Tyrosinadsorption	: 1 : 2,24
	nach Eisenhdroxydadsorpt.	: 1 : 8,38
	im Eisenadsorbat	: 1 : 1,36

9. Adsorption mit Hippursäure, Elution des Hippursäureadsorbats.

24 ccm Enzymlösung X mit 68 N.-er.-e. und 6 H.-E. (siehe Tabelle 17 Vorbem.) werden bei p_H = 7,1 mit 24 ccm n/1 Natriumhippuratlösung versetzt und im Gesamtvolumen von 74,4 ccm unter Eiskühlung mit 24 ccm n/1 Essigsäure die Hippursäure ausgefällt. Beim Zentrifugieren erhält man einen dunkelbraunen Niederschlag und eine hellgelbe Lösung (60 ccm). Letztere enthält noch 1,07 N.-er.-e. (1,5 ccm in 1440 Min. 0,80 ccm n/10 Säure = 0,0268 N.-er.-e.) und 0,05 H.-E. (24 ccm in 24 Stdn. 0,08 ccm n/10 Säure = 0,02 H.-E.). Der Hippursäureniederschlag wurde einmal gewaschen mit 30%igem Glycerin, dann 5 Min. digeriert mit 16 ccm einer Mischung von 1 Teil 87 %igem Glycerin und 2 Teilen Ammoniak-Ammonchloridgemisch (1 : 1; 2,5 n.) ; durch Zentrifugieren trennt man einen dunkelbraunen Niederschlag von einer hellbraunen Lösung, die mit Essigsäure neutralisiert wird. Sie hat die Wirksamkeit von 2,8 N.-er.-e. (1,2 ccm in 205 Min. 0,9 ccm n/10 Säure = 0,21 N.-er.-e.) und von ca. 1,35 H.-E. (3,2 ccm in 96 Stdn. 3,2 ccm n/10 Säure = 0,27 H.-E.).

10. Adsorption mit Casein.

15 ccm Glycerinextrakt XI (Erepsin: 0,5 ccm in 30 Min. 0,85 ccm n/10 Säure = 1,35 N.-er.-e.; Histozym: 2 ccm in 24 Stdn. 3,0 ccm n/10 Säure = 0,90 H.-E.) werden in Kältegemisch abgekühlt, mit 15 ccm 6 %iger, eisgekühlter Caseinlösung versetzt, durchgeschüttelt, nach 1 Min. langem Stehen im Kältegemisch 2,1 ccm n/1 Essigsäure unter Umschütteln zugegeben, das ausgefällte Casein unter Eiskühlung auf einem mit Glycerin befeuchteten Filter abgetrennt. Die Bestimmung des Enzym-

gehalts im Filtrat ergab für Erepsin: 1 ccm Filtrat (entspr. ca. 0,5 ccm Extrakt XI) in 90 Min. 0,4 ccm n/10 Säure = 0,20 N.-er.-e. Für Histozym: 4 ccm Filtrat (= ca. 2 ccm Extrakt XI) in 24 Stdn. 0,15 ccm n/10 Säure = 0,04 H.-E.

11. Elution mit Phosphatpuffern von verschiedenem p_H aus Tonerdeadsorbaten.

a) Elution mit sekundärem Natriumphosphat.

Herstellung des Tonerdeadsorbates aus 12 ccm Glycerinextrakt X (33,36 N.-er.-e. und 2,96 H.-E.) durch Adsorption mit 2,4 ccm Tonerde im Gesamtvol. von 24 ccm. Enzymgehalt der Adsorptionsrestlösung: 3,9 N.-er.-e. (0,8 ccm in 301 Min. 0,80 ccm n/10 Säure = 0,13 N.-er.-e.) und 0,72 H.-E. (8 ccm in 24 Stdn. 1 ccm n/10 Säure = 0,24 H.-E.). Enzymgehalt des Adsorbates also: 29,46 N.-er.-e. und 2,24 H.-E.

H.-E. : N.-er.-e. = 1 : 13,2

Das Adsorbat wurde wie üblich gewaschen, dann digeriert mit 24 ccm einer Mischung von 8 ccm 87 %igem Glycerin, 8 ccm m/5 Na_2HPO_4 , 8 ccm Wasser.
Die Elution+) enthielt 8,20 N.-er.-e. (1,2 ccm in 68 Min. 0,60 ccm n/10 Säure = 0,41 N.-er.-e.) = 28% des Adsorbates und 0,72 H.-E. (6ccm - im üblichen Bestimmungsansatz, jedoch ohne Pufferzusatz, da in 6 ccm Elution 2 ccm m/5 Phosphat - in 24 Stdn. 0,60 ccm n/10 Säure = 0,145 H.-E.; mit Berücksichtigung der Hemmung durch Phosphat in Wirklichkeit ca. 25% mehr (siehe Tabelle 4, Nr. 6 und 7): 0,75 ccm = 0,18 H.-E.) = 32 % des Adsorbates.

H.-E. : N.-er.-e. = 1 : 11,4

b) Elution mit Phosphatgemisch vom p_H = 7,0.

Das nach a) hergestellte und ausgewaschene Tonerdeadsorbat wurde digeriert mit 24 ccm einer Mischung von 8 ccm Glycerin, 8 ccm Wasser und 8 ccm m/5 Phosphatpuffer (primär:sekundär = 1:2). Enzymgehalt der Elution: 3,5 N.-er.-e. = 12 % des Adsorbats (1,2 ccm in 425 Min. 1,45 ccm n/10 Säure= 0,175 N.-er.-e.) und 0,32 H.-E. = 14 % des Adsorbats (6 ccm im üblichen Ansatz, jedoch ohne Puffer in 24 Stdn. 0,35 ccm n/10 Säure = 0,08 H.-E.).

H.-E. : N.-er.-e. = 1 : 11.

+) Das pH der Elutionsflüssigkeit war nach Trennung von der Tonerde um ca. 1 bis 1 1/2 Einheiten ins saure Gebiet verschoben; bei der Elution war also Alkali verbraucht worden.

c) Elution mit Primärphosphat.

Das nach a) hergestellte Tonerdeadsorbat wird behandelt mit 24 ccm einer Mischung von 8 ccm Glycerin, 8 ccm m/5 KH_2PO_4, 8 ccm Wasser. Enzymgehalt der Elution: 1,46 N.-er.-e. = 5 % des Adsorbats (1,2 ccm in 1187 Min. 0,90 ccm n/10 Säure = 0,073 N.-er.-e.) und keine meßbare Menge Histozym (6 ccm im üblichen Ansatz ohne Phosphatpuffer in 24 Stdn. keine Spaltung).

Histozymfreies Erepsin.

12. Elution mit Ammoniak.

a) Aus Kaolin.

Teil III B 5 a und b.

b) Aus Tonerdeadsorbaten.

Versuch 1: Das nach III B 11 a hergestellte Tonerdeadsorbat wird eluiert mit 24 ccm einer Mischung von 8 ccm 87%igem Glycerin und 16 ccm n/40 Ammoniak. Enzymgehalt: 7,4 N.-er.-e. = 25% des Adsorbats (1 ccm in 67 Min. 0,45 ccm n/10 Säure = 0,308 N.-er.-e.) und 0,36 H.-E. = 16% des Adsorbats (3 ccm in 48 Stdn. 0,35 ccm n/10 Benzoesäure = 0,045 H.-E.).

H.-E. : N.-er.-e. = 1 : 20,6

c. Fraktionierte Elution mit Ammoniak.

Versuch 2: Das Tonerdeadsorbat wird zweimal eluiert mit je 24 ccm einer Mischung von 8 ccm 87%-igem Glycerin, 6 ccm n/40 Ammoniak, 10 ccm Wasser.

1. Elution: 1,12 N.-er.-e. = 3,8 % des Adsorbates (1,5 ccm in 194 Min. 0,30 ccm n/10 Säure = 0,07 N.-er.-e.) und kein Histozym (9 ccm in 48 Stdn. ---- ccm).

Histozymfreies Erepsin.

2. Elution: 2,25 N.-er.-e. = 7,7 % des Adsorbates (1,5 ccm in 180 Min. 0,55 ccm n/10 Säure = 0,14 N.-er.-e.)und 0,36 H.-E. = 16 % des Adsorbats (9 ccm in 48 Stdn. 1,05 ccm n/10 Säure = 0,14 H.-E.).

H.-E. : N.-er.-e. = 1 : 6,2

d) Elution aus Eisenadsorbat.

Teil III B 17.

13. Elution mit Hippurat.

a) Aus Kaolin.

16 ccm Enzymlösung VIII wurden bei p_H = 7,1 im Gesamtvolumen von 48 ccm adsorbiert mit 12 ccm Kaolinsuspension. Das Adsorbat wurde dreimal gewaschen mit 20 ccm 30 %igem Glycerin; bei der Behandlung mit 48 ccm m/5 Natriumhippuratlösung (pH = 7,1) wurde eine stark rot gefärbte Elution +)erhalten, die 0,1 H.-E. enthielt (24 ccm in 24 Stdn. 0,1 ccm n/5 Säure = 0,05 H.-E.); eine nochmalige Digestion des Adsorbates mit 48 ccm n/40 Ammoniak (30 % Glyceringehalt) lieferte eine nur schwach gefärbte Lösung, die neben 0,69 N.-er.-e. (3 ccm in 205 Min. 0,1 ccm n/5 Säure = 0,043 N.-er.-e.) 0,60 H.-E. enthielt (24 ccm in 24 Stdn. 0,64 ccm n/5 Säure = 0,30 H.-E.).

b) Aus Eisenhydroxydadsorbaten.

12 ccm Glycerinextrakt X mit 34 N.-er.-e. und 2,88 H.-E. (siehe Tabelle 17, Vorbem.) werden im Gesamtvolumen von 36 ccm bei p_H 4,7 voradsorbiert mit 0,4 ccm Eisenhydroxydsuspension; die Restlösung enthaltend 2,72 N.-er.-e. und 2,48 H.-E. (siehe Tabelle 17, Nr. 3) wird zweimal adsorbiert mit je 1,20 ccm Eisenhydroxyd; die beiden letzten Adsorbate werden vereint, zweimal gewaschen mit je 20 ccm einer Mischung von 6 ccm 87 %igem Glycerin, 1 ccm Acetatpuffer vom pH = 4,7, 13 ccm Wasser, dann behandelt mit 24 ccm eines Gemisches von 8 ccm Glycerin, 8 ccm n/1 Natriumhippurat (pH = 7,1), 8 ccm Wasser. Die Hippuratelution enthält 0,46 N.-er.-e. (1,2 ccm in 1451 Min. 0,70 ccm n/10 Säure — nach Abzug des Wertes, der auf die Spaltung der Hippursäure durch Histozym entfällt und der in einem besonderen Versuch ermittelt wurde — = 0,023 N.-er.-e.) und 0,72 H.-E. (8 ccm in 24 Stdn. 0,50 ccm n/10 Säure).

H.-E. : N.-er.-e.			
	Ausgangslösung	:	1 : 11,8
	nach der 1.Eisenads.	:	1 : 1,1
	im letzten Eisenads.	:	1 : 1,1
	in der Hippuratelution	:	1 : 0,64

c) Aus Proteinen.

Teil III B 16 a.

14. Spezifische Elution des Trepsins mit Leucyl-Glycin aus Eisenhydroxydadsorbaten.

Teil III B 17.

+) Das pH der Elutionsflüssigkeit war nach der Trennung vom Kaolinadsorbat um ca. 1/2 Einheit ins saure Gebiet gerückt; bei der Elution war also Alkali verbraucht worden.

15. Temperaturbeständigkeit des Histozyms im Vergleich zum Nierenerepsin.

a) Verhalten verdünnten Glycerinextraktes bei 70^{0} in verschiedenem p_H.

aa) bei $p_H = 7,0$

40 ccm Enzymlösung VIII enthaltend 27,2 N.-er.-e. (1 ccm in 75 Min. 1,05 ccm n/10 Säure = 0,68 N.-er.-e.) und 3,7 H.-E. (4 ccm in 24 Stdn. 1,5 ccm n/10-Säure = 0,37 H.-E.), wurden mit dem gleichen Vol. Wasser verdünnt bei 70^{0} im Ölbad erhitzt, nach der angegebenen Zeit eine geeignete Portion schnell abgekühlt und zur Bestimmung von Erepsin und Histozym verwendet (Tabelle 22).

Die Werte für Erepsin beziehen sich auf 2 ccm, für Histozym auf 8 ccm erhitzten Extrakt entspr. 1 bezw. 4 ccm ursprüngliche Enzymlösung.

bb) bei $p_H = 8,4$

30 ccm Enzymlösung VIII wurden mit 6,7 ccm 2,5/n Ammoniak und 2,5 ccm Ammoniak-Ammonchloridpuffer (1 : 4 ; 2,5 n.) versetzt und wie unter aa) behandelt. Die Zahlen der Erepsinbestimmung beziehen sich auf 1 ccm, der Histozymbestimmung auf 2 ccm erhitzten Extraktes entspr. ca. 0,75 bezw. 1,5 ccm der Enzymlösung VIII.

cc) bei $p_H = 4,7$.

24 ccm Enzymlösung VIII wurden nach Zusatz von 3 ccm n/1 Essigsäure und 1 ccm Essigsäurenatriumacetatpuffer (1 : 1 ; n/1) behandelt wie unter bb).

Tabelle 22.

Nr.	Erhitzen p_H	Dauer Min.	Zeit Min.	Erepsin - Gehalt ccm n/10 S.	N. er.-e.	% v. Gl. Extr. VIII	Histozym - Gehalt Zeit Std.	ccm n/10 S.	H.-E.	% v. Gl. Extr. VIII
aa	7,0	10	151	0,80	0,25	37	24	1,10	0,27	73
"	"	30	156	0,60	0,18	26	24	0,55	0,13	35
"	"	60	166	0,20	0,05	8	24	0,55	0,13	35
"	"	240	246	0,20	0,036	5,3	24	0,28	0,07	19
bb	8,4	60	137	0,40	0,13	26	48	-	-	-
"	"	240	225	0,40	0,08	16	"	-	-	-
cc	4,7	60	145	-	-	-	48	-	-	-
"	"	240	232	-	-	-	"	-	-	-

b) Verhalten unverdünnter Glycerinextrakte bei 70 und 85° .

Je eine Portion von Glycerinextrakt VIII (1 ccm 0,68 N.-er.-e.; 4 ccm = 0,37 H.-E.) wurde auf 70° bezw. 85° erhitzt. Nach der angegebenen Zeit wird eine geeignete Menge rasch abgekühlt und der Enzymgehalt bestimmt. Die Spaltungswerte in Tabelle 23 verstehen sich für 1 ccm Extrakt bei Erepsin, für 4 ccm bei Histozym.

Tabelle 23.

Nr.	t	Dauer Stdn.	Zeit Min.	Erepsin ccm n/10 S.	Gehalt N.-er.-e.	% v.Gl. Extr. VIII.	Zeit Std.	Histozym ccm n/10 S.	Gehalt H.-E.	%v.Gl. Extr. VIII.
1	70°	1	157	1,20	0,38	56	24	1,20	0,30	81
2	"	2	153	0,60	0,18	27	"	1,0	0,25	68
3	"	4	110	0,50	0,20	30	"	1,05	0,25	68
4	"	8	1020	1,60	0,08	12	"	1,0	0,25	68
5	85°	1	143	0,05	0,015	2	"	-	-	-
6	"	4	218	0,05	0,01	1,5	"	-	-	-

16. Adsorptionsverhalten der nach III B 15 b gewonnenen Enzymlösung.

a) Adsorption des Histozyms an hitzedenaturiertes Eiweiß. Elution mit Hippurat.

Eine Portion Glycerinextrakt VIII (H.-E.:N.-er.-e = 1 : 7,4) wird 4 Stdn. bei 70° erhitzt. 4 ccm davon enthalten:

0,64 N.-er.-e. und 0,22 H.-E.

(H.-E. : N.-er.-e. = 1 : 2,9).

siehe Tabelle 24, Nr. 1

5 ccm des so behandelten Extraktes läßt man noch heiß in 25 ccm Eiswasser (im Kältgemisch gefroren, nicht ganz wieder aufgetaut) einlaufen und zentrifugiert sofort vom

Niederschlag ab. 24 ccm der Restlösung entspr. 4 ccm Glycerinextrakt VIII enthalten nach Tab. 24, Nr. 2

0,64 N.-er.-e. und 0,02 H.-E.

Der schwerlösliche Anteil, der durch Erhitzen denaturiertes Eiweiß enthält, wird mit einer Mischung von 5 ccm Glycerin und 25 ccm Wasser angeschüttelt. 24 ccm dieser Suspension (entspr. 4 ccm ursprünglichen Glycerinextraktes) enthalten nach Tab. 24, Nr.3:

0,25 H.-E.

12 ccm der Eiweißsuspension werden mit n/1 Ammoniak bis zur teilweisen Lösung des Niederschlages versetzt, [illegible] schnell auf der Zentrifuge vom Ungelösten getrennt und in der Lösung die Histozymwirkung bestimmt. Sie ist nach Tabelle 24 Nr. 4 = Null.

5 ccm des wie oben erhitzten Extraktes VIII läßt man noch heiß in einem Gemisch von 5 ccm n/1-Natriumhippuratlösung vom p_H = 7,1 + 20 ccm Wasser einfließen, schüttelt gut durch und zentrifugiert schnell ab. 24 ccm der Lösung (entspr. 4 ccm des ursprünglichen Glycerinextraktes VIII) enthalten nach Tab. 24, Nr. 5:

0,032 N.-er.-e. und 0,20 H.-E.

H.-E. : N.-er.-e. = 1 : 0,16

Verschiebung gegen Glycerinextrakt VIII = 1 : 46.

Histozymausbeute: 54% von Enzymlösung VIII.

Erepsinausbeute : 1,18% von Enzymlösung VIII.

Tabelle 24.

Nr.	Erepsinbestimmung ccm E.Lsg.	Zeit Min.	ccm n/10 S.	N.-er.-e.	Histozymbestimmung ccm E.Lsg.	Zeit Std.	ccm n/10 S.	H.-E.
1	1	234	0,80	0,16	4,0	24	0,95	0,22
2	1,5	1140	0,95	0,04	12	96	0,15	0,01
3	-	-	-	-	12	96	1,75	0,125
4	-	-	-	-	12	96	0,05	-
5	1,5	1140	0,05+)	0,002	12	96	1,35	0,10

+) Nach Abzug des auf die Spaltung der Hippursäure durch Histozym treffenden Anteils, der in einem besonderen Versuch ermittelt wurde.

b) Adsorption der nach III B 16 a gewonnenen Hippuratlösung mit Kaolin. Reversible Inaktivierung des Histozyms durch Kaolin.

Glycerinextrakt XI in 4 ccm enthaltend:

10,8 N.-er.-e. und 1,8 H.-E.

(0,5 ccm in 30 Min. 0,85 ccm n/10 Säure = 1,35 N.-er.-e.; 2 ccm in 24 Stdn. 3,0 ccm n/10 Säure = 0,90 H.-E.) wird 4 Stdn. lang auf 70° erhitzt; Enzymgehalt in 4 ccm:

0,96 N.-er.-e. und 1,11 H.-E.

(0,5 ccm in 955 Min. 2,05 ccm n/10 Säure = 0,12 N.-er.-e.; 4 ccm in 24 Stdn. 4,25 ccm n/10 Säure = ca. 1,11 H.-E.).

Vom erhitzten Extrakt werden je 5 ccm noch heiß eingegossen in eine Mischung von 5 ccm n/1 Natriumhippurat + 20 ccm Wasser und vom ausgeschiedenen Protein abzentrifugiert. Enzymgehalt von 24 ccm Hippuratlösung (entspr. 4 ccm Extrakt XI):

0,07 N.-er.-e. und 0,80 H.-E.

(1,5 ccm in 1003 Min. 0,1 [+]) ccm n/10 Säure = 0,0044 N.-er.-e.; 18 ccm in 48 Stdn. 4,5 ccm n/10 Säure = 0,60 H.-E.).

24 cmm dieser Enzymlösung werden mit 6 ccm Kaolinsuspension durchgeschüttelt und das Adsorbens auf der Zentrifuge abgetrennt. 30 ccm der Adsorptionsrestlösung (entspr. 4 ccm Extrakt XI) enthalten dann noch:

0,66 H.-E.

(18 ccm in 24 Stdn. 1,40 ccm n/10 Säure = 0,40 H.-E.)

Das Adsorbat wird zweimal mit 24 ccm 30%igem Glycerin gewaschen, dann eluiert mit 24 ccm Elutionsflüssigkeit (ein Teil Glycerin, zwei Teile n/40 Ammoniak). In der Elution befand sich keine nennenswerte Menge Histozym (12 ccm in 24 Stdn. 0,03 ccm n/10 Säure).

Das Adsorbat wurde aufgeschlämmt in 24 ccm 30%igem Glycerin; 12 ccm der Suspension geben in 24 Stdn. keine Spaltung.

Bestimmung von Histozym in Kaolinadsorbaten:

Hemmung des Histozyms durch Kaolin.

3 ccm Glycerinextrakt XI (8,1 N.-er.-e. und 1,35 H.-E.) werden bei p_H = 7,0 mit 6,75 ccm Kaolinsuspension im Gesamtvolumen von 32 ccm durchgeschüttelt; die Bestimmung

---

[+]) Nach Abzug der Spaltung des Hippurats durch das Histozym.

des Histozymgehalts, ausgeführt ohne Abtrennung des Kaolins, ergab 0,44 H.-E. = 33 %. (18 ccm in 24 Stdn. 1 ccm n/10 Säure = 0,25 H.-E.) Kaolin hemmt die Histozymwirkung; da nach III B 5 a aus dem abgetrennten Kaolin das Histozym quantitativ eluiert werden kann, muß keine Enzymzerstörung, sondern eine (durch Elution) reversible Inaktivierung vorliegen.

17. Trennung des Histozyms von Nierenerepsin und -Esterase.

Adsorption der nach III B 16 a gewonnenen Hippuratlösung mit Eisenhydroxyd, Elution des Erepsins aus Eisenhydroxyd mit Ammoniak oder Leucylglycin. Erepsin- und esterasefreies Histozym.

a) Glycerinextrakt XI enthaltend in 2 ccm:

5,4 N.-er.-e. und 0,9 H.-E.

wird 4 Stdn. auf 70° erhitzt; 2 ccm enthalten dann noch (Tabelle 25 a):

0,32 N.-er.-e. und 0,40 H.-E.

b) Die nach III B 16 a hergestellte Hippuratlösung enthält in 12 ccm (Tabelle 25 b):

0,132 N.-er.-e. und 0,30 H.-E.

c) Sie wird bei p_H = 4,4 mit Eisenhydroxyd adsorbiert (3,3 ccm Adsorbens auf 30 ccm). Das Adsorbat wird nach zweimaligem Auswaschen mit 30 %igem Glycerin, durchgeschüttelt mit so viel 30 %igem Glycerin, als die angewandte Hippuratlösung betrug. 12 ccm dieser Adsorbataufschlämmung enthielten (Tabelle 25 c):

0,2 N.-er.-e. und 0,40 H.-E.

d) Eine Portion davon wird mit Ammoniak versetzt (0,1 ccm n/1 Ammoniak pro 10 ccm), gut durchgeschüttelt und zentrifugiert. 12 ccm der Ammoniakelution enthalten (Tabelle 25 d):

0,2 N.-er.-e. und 0,16 H.-E.

e) Das Adsorbat wird mit 30 %igem Glycerin gewaschen und dann aufgeschlämmt mit so viel 30 %igem Glycerin, als die Elutionsflüssigkeit betrug. 12 ccm dieser Suspension enthalten (Tabelle 25 e):

0,14 H.-E. erepsinfrei.

Ausbeute: 16 % vom Ausgangsmaterial.

f) 30 ccm der unter c) genannten Aufschlämmung werden zentrifugiert, das Adsorbat digeriert: einmal mit 30 ccm, dann zweimal mit je 15 ccm einer Mischung aus 6 ccm der zur Erepsinbestimmung dienenden Leucylglycinlösung (p_H = 7,8) + 3,3 ccm n/10 HCl + 50,7 ccm Wasser.

Die erste Leucylglycinelution enthielt in 12 ccm (Tabelle 25 f):

0,2 N.-er.-e. und 0,1 H.-E.

g) und h) Der Rückstand von der Leucylglycinelution wurde zur Häfte mit 15 ccm Ammoniak (1Teil Glycerin, 2 Teile n/40 Ammoniak) eluiert, zur andern Hälfte in 15 ccm 30 %igem Glycerin aufgeschlämmt. 12 ccm Ammoniakelution enthielten (Tabelle 25 g):

0,1 H.-E. erepsinfrei.

Ausbeute an erepsinfreiem Histozym: 11 % des Ausgangsmaterials.

12 ccm der Aufschlämmung enthielten (Tabelle 25 h):

0,15 H.-E. erepsinfrei .

Ausbeute an erepsinfreiem Histozym: 17 % des Ausgangsmaterials.

Tabelle 25.

Die Spaltungswerte verstehen sich bei Erepsin auf je 1 ccm in der angegebenen Zeit, bei Histozym auf 2 ccm bei a), sonst auf 12 ccm durchgängig in 24 Stdn.

Nr.	Erepsinbestimmung Zeit Min.	ccm n/10 S.	N.-er.-e.	Histozymbestimmung ccm n/10 S.	H.-E.
a	238	0,80	0,16	1,60	0,40
b	995	0,25+)	0,011	1,20	0,30
c	935	0,35	0,017	1,60	0,40
d	935	0,35	0,017	0,55	0,16
e	985	-	-	0,50	0,14
f	935	0,35	0,017	0,05	0,01
g	995	-	-	0,42	0,10
h	996	-	-	0,63	0,15

+) Nach Abzug des auf die Hippursäurespaltung durch Histozym treffenden Betrages.

Prüfung des erepsinfreien Histozympräparats (Adsorbataufschlämmung) auf Esterase:

Ansatz wie unter II C Nr. 3 beschrieben, also unter Zusatz von Calciumchlorid, Natriumoleat und Albumin; 20 ccm Suspension (h); in 5 Stdn. 40 Min. keine Spaltung.

Haltbarkeit der erepsin- und esterasefreien Histozympräparate.

1) Ammoniakelution nach g , neutralisiert mit Essigsäure, 4 Tage im Eisschrank aufbewahrt: 12 ccm geben in 24 Stdn. nur noch 0,15 ccm n/10 Säure Spaltung = 0,04 H.-E. Der Histozymgehalt ist also auf 40 % gesunken.

2) Eisenhydroxydsuspension nach h , 8 Tage im Eisschrank aufbewahrt: 12 ccm geben in 24 Stdn. 0,63 ccm n/10 Säure Spaltung = 0,15 H.-E. Das reine Histozym ist in dieser Form haltbar.

IV.

ZUR SPEZIFITÄT DES HISTOZYMS.

Die nachfolgenden Ausführungen stellen keinen Abschluß dar, sie umreißen das Gebiet einer späteren Untersuchung nach den Anregungen, die sich dazu aus dieser Arbeit ergeben. Nach den Erfahrungen des vorigen Kapitels (III B 16b und III B 5 a) ist Histozym in Kaolinadsorbaten unwirksam, kann daraus jedoch durch Alkali in wirksamer Form wieder abgelöst werden. In Eisenhydroxydadsorbaten (III B 17; Tabelle 26,Nr.5 und 7) ist seine enzymatische Fähigkeit uneingeschränkt; zur Erklärung dieser Tatsache erscheint die Eluierbarkeit durch Substrat (III B 13 b) und Phosphatpuffer quantitativ ungenügend. Wir werden annehmen müssen, daß die Fermentteilchen nicht in beliebiger Lage am Adsorbens verankert sind; am Kaolin

werden sie mit den für die Bindung des Substrats nötigen Gruppen haften, im Eisenhydroxydadsorbat wird eine für die enzymatische Wirkung unwesentliche Stelle des Enzymmoleküls die Bindung vermitteln. Beide Fälle finden sich z.B. auch bei den noch lipatisch wirksamen Tonerde- und Kaolinadsorbaten der Pankreaslipase einerseits, bei den unwirksamen Adsorbaten an Tristearin andererseits verwirklicht[1]. Aus der sauren Natur des Kaolins dürfen wir auf basische Eigenschaften der aktiven Gruppe des Histozyms schließen. Die Haftstelle am Substrat ist aber keine freie Carboxylgruppe: Hippursäureäthylester wird durch esterasefreies Enzym gespalten (Tabelle 26 Nr. 5). Ebenso werden hydrolysiert Benzamyd, Benzanilid (nur mit Rohenzym geprüft) und Dibenzoylputrescin (auch von gereinigten Enzym: Tabelle 26). Dem Angriff unterliegt nicht O-gebundenes Benzoyl z.B. in Pentabenzoylglukose (Tabelle 26, Nr.6) und in Tribenzoicin[2].

Von den Angaben der Literatur interssiert noch besonders die von A.W.DOX[3] für Pilzenzym angegebene, für Nierenhistozym nachzuprüfende Hydrolyse von Acetylglycin in Gegenüberstellung zum Glycylglycin. Dieses wird von Erepsin, nicht von Histozym - jenes von Histozym, nicht von Erepsin gespalten. Während die freie Aminogruppe für das Erepsin[4] nötig ist, stört sie offenbar

---

1) R.WILLSTÄTTER, E.WALDSCHMIDT-LEITZ u. F.MEMMEN, H. 125, 119, 120 (1923).

2) M.NENKI mit E.BLANK u. A.PANOWA, l.c.

3) l.c.

4) H.v.EULER, l.c.
E.WALDSCHMIDT-LEITZ u.Mitarbeiter,in Veröffentlichung.

die Wirkung des Histozyms. Auch Trypsin wird von einer freien Aminogruppe gehemmt (Glycyltyrosin[1]); diese kann jedoch unschädlich gemacht werden durch Substitution (Benzoylglycyltyrosin[2]) oder durch weite Entfernung von der Angriffsstelle des Enzyms am Substrat (Leucyltriglycyltyrosin[1]). So entsteht die Frage: Ist es wohl möglich, daß eine Peptidbindung z.B. im Glycylglycin von Histozym gelöst wird, wenn die freie Aminogruppe substituiert ist - es kommt hierfür natürlich nicht der Benzoyl- oder Acetyl-, sondern entweder der Methyl- oder Toluolsulfo- bezw. Naphtalinsulforest in Frage; letzterer ist ja nach Tabelle 26 Nr. 4 gegen Histozym resistent - ; ist es möglich, daß eine Peptidbindung durch Histozym gelöst wird, wenn die freie Aminogruppe entsprechend weit vom Reaktionsort entfernt ist ?

Versuche: 0,6053 g Benzamid (1) bezw. 0,9855 g Benzanilid (2), 1,6606 g Dibenzoylputrescin (3) - jeweils 0,005 Mol, 0,53 g ß-Naphtalinsulfoglycin (4) - 0,002 Mol - und 4 ccm Enzymlösung X (=0,96 H.-E.).

1,036 g Hippursäureäthylester (0,005 Mol) (5) bezw. 0,7 g = 0,001 Mol. Benzoylglukose (6) bezw. 0,83 g = 0,0025 Mol. Dibenzoylputrescin (7) mit 12 ccm eines Eisenhydroxydadsorbates von Histozym (erepsin- und esterasefrei).

Gesamtvolumen 25 ccm; p_H = 7,1; Temperatur 30°; Zeit für Versuch 1 bis 4 6 Tage; Vers. 5 bis 7 10 Tage.

Bei Versuch 4 wurde der ganze Ansatz mit Alkohol bis zu einem Gehalt von 90% versetzt und mit Thymolphtalein als Indikator titriert; von der so ermittelten Acidität wird die eines zu Beginn der Bestimmung angestellten Kontrollversuchs abgezogen. Bei den übrigen Versuchen Bestimmung der abgespaltenen Benzoesäure wie früher.

---

1) WALDSCHMIDT-LEITZ, W.GRASSMANN u.H.SCHLATTER, l.c.

2) E. WALDSCHMIDT-LEITZ u.Mitarbeiter,inVeröffentlichung.

+) Vgl. die Titration von Aminosäuren,Peptiden,Benzoylaminosäuren u. -Peptiden in 90%igem bezw. 50%igem Alkohol.

Die nachstehenden Zahlen verstehen sich nach Abzug von geringen Beträgen für nichtenzymatische Spaltung des Substrates oder bei Versuch 4 für Selbstverdauung der Enzymlösung, die in eigenen Versuchen ermittelt wurden.

Tabelle 26.

Nr.	Substrat	Spaltung ccm n/10 Sre.	Enzymlösung
1	Benzamid	0,36	rohe Enzym-Lösung
2	Benzanilid	0,65	
3	Dibenzoylputrescin	0,12	
4	ß-Naphtalinsulfoglycin	-	
5	Hippursäureäthylester	0,63	reines Histozym
6	Benzoylglukose	-	
7	Dibenzoylputrescin	0,15	

LEBENSLAUF.

Geboren am 27. Januar 1899 zu Schönwald (B.A.Rehau in Oberfranken) als Sohn des prot. Pfarrers A.Dorfmüller und seiner Ehefrau Marie, geb. Riedel, besuchte ich die Volksschule in meinem Geburtsort, das Progymnasium Windsbach (Mfr.), das Neue Gymnasium zu Nürnberg, wo ich ein Jahr lang als Hauslehrer tätig war, das Gymnasium zu St. Anna in Augsburg und das Humanistische Gymnasium zu Bayreuth. Für das Maximilianeum vorgeschlagen, mußte ich zum Militärdienst einrücken und zwar bei der Feld-Art. ab Oktober 1917; vom Januar 1918 ab war ich im Felde, nach meiner Verwundung am 24. April 1918 im Lazarettund dann in der Garnison bis Januar 1919. April und Mai 1919 diente ich im Freikorps Epp und beteiligte mich an der Befreiung Münchens von der Räteherrschaft. Als stud. phil. et theol. war ich vom Zw.S. 1919 bis W.S. 1919/20 in Erlangen, S.S. 1920 in München immatrikuliert. W.S. 1920/21 begann ich das Studium der Chemie in der anorganischen Abteilung des Herrn Professor W.PRANDTL, in der Inflationszeit häufig unterbrochen durch den verschiedenartigsten Werkstudentendienst; am 2. Mai 1924 legte ich das erste, am 22. Juni 1925 das zweite Verbandsexamen ab. Meine Doktorarbeit beschäftigte mich vom Mai 1926 bis März 1927. Vom Mai 1926 bis März 1927 war ich Unterrichtsassistent, dann bis März 1928 Assistent im Privatlaboratorium (Roentgenstation) bei Herrn Professor W.PRANDTL.

DRUCKFEHLER-BERICHTIGUNG

Seite 2
13. Zeile .....am Beispiel des Benzoylalanins ...

Seite 13
1. Zeile .....Individuen

Seite 20
15. Zeile .....K.JOSEPHSON und H v.EULER[1])

Seite 23
22. Zeile .....Zeiten gleichen Umsatzes

Seite 24
Tabelle 6

Enzymlsg. ccm	8			4			2		
Zeit Stunden	a	b	c	a	b	c	a	b	c

Seite 27
2.u.3.Zeile .....Thymol-

phtaleinlösung.....

Seite 30
6. Zeile ..... des Substrates..

Seite 57 7. Adsorption mit Tyrosin, dann mit Tonerde.
.....
.....
vorletzte und letzte Zeile dieses Absatzes müssen lauten: ".....
dagegen noch 1,44 N.-er.-e. (3,2 ccm in 227 Min. 0,3 ccm n/5 Säure = 0,12 N.-er.-e.)."

Seite 69
14. Zeile Benzamid, ...

Seite 69
15. Zeile ..... (auch von gereinigtem Enzym: .....